



**Ana Carina Marques  
dos Santos**

**Microbiologia do ar: monitorização do ar em  
ambiente hospitalar**



**Ana Carina Marques  
dos Santos**

**Microbiologia do ar: monitorização do ar em  
ambiente hospitalar**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Ana Cristina Sarmento, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

**Prof. Dra. Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso**  
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Dra. Myriam Alexandra dos Santos Batalha Dias Nunes Lopes**  
professora auxiliar convidada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

**Prof. Dra. Ana Cristina de Fraga Esteves Sarmento**  
professora auxiliar convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Ao Prof. Dr. António Correia, por me ter dado a possibilidade de realizar este estudo no laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

À Dra. Cristina Sarmento, pelos seus ensinamentos, por todo o apoio em momentos mais difíceis, estas palavras são poucas para agradecer tudo o que fez por mim. Muito Obrigada!

À Administração do Hospital, pela autorização para a realização do estudo.

Ao Dr. Paulo Tavares, Director do Serviço de Patologia Clínica, pela disponibilidade que demonstrou em ajudar, por facilitar o meu trabalho dentro do serviço, obrigada por todo o apoio.

À Dra. Cláudia Pereira, representante da BioMérieux, obrigada por me ter facilitado o instrumento mais valioso para a realização desta dissertação.

À minha equipa do laboratório, em especial, um muito obrigada para vocês, Xana, Mamede, Abel e toda a equipa de auxiliares de acção médica, sem a vossa preciosa ajuda seria tudo mais difícil.

À toda a equipa dos Serviços de Bloco Operatório e Esterilização, obrigada pela atenção.

A todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, em especial à família Salvador, obrigada pela amizade.

À minha mãe, irmão e primo Hugo, obrigada pelo vosso encorajamento nos momentos mais difíceis, pela confiança e amor transmitidos. Estarão sempre no meu coração!

A ti Gil, simplesmente por teres aparecido na minha vida, transmitindo-me coragem, força e muito animo, e por todo o carinho e apoio incondicional, assim é mais fácil ser feliz...

## palavras-chave

**microbiologia do ar, hospital, bloco operatório, qualidade do ar interior, infecção nosocomial**

## resumo

O complexo ambiente hospitalar requer atenção especial, para assegurar uma saudável qualidade do ar interior, protegendo assim os profissionais de saúde e utentes de infecções nosocomiais e de doenças ocupacionais.

Embora seja amplamente reconhecido que a contaminação de um bloco operatório seja a principal responsável pela complicação de uma cirurgia, em Portugal, estudos sobre microbiologia do ar a nível hospitalar são escassos.

O objectivo deste estudo é investigar a variabilidade de microrganismos existente no bloco operatório de um Hospital Distrital localizado na zona Nordeste de Portugal.

A recolha de amostras decorreu durante o período de um mês (Julho de 2008), bissemanalmente, totalizando um total de 8 colheitas. Os locais de colheita foram o ponto central da sala de ortopedia e o local de acesso ao bloco (local de referência), que não possui um sistema AVAC.

Foram ainda efectuadas 3 colheitas no Serviço Central de Esterilização, que possui um sistema de climatização UTA.

O método de colheita foi o de impactação de ar em meio de agar, tendo-se utilizado para o efeito um colector de ar, airIDEAL®, da casa comercial bioMérieux. Foram utilizados meios específicos para o crescimento de bactérias e de fungos.

Verificou-se que a concentração de Unidades Formadoras de Colónias existentes no ar do bloco operatório era inferior ao do ar no local de referência. Observou-se ainda um maior número de bactérias do que fungos, ocorrendo o mesmo no Serviço Central de Esterilização.

Os microrganismos predominantes nas 8 colheitas foram *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus cohnii cohnii*, não tendo sido encontrados microrganismos patogénicos. No entanto, alguns dos microrganismos identificados foram já descritos noutros trabalhos como patogénicos oportunistas. Quanto à caracterização das resistências a antibióticos, foram encontrados isolados de: *Staphylococcus cohnii cohnii* e *Staphylococcus caprae*, que apresentam um elevado grau de resistências às penicilinas e macrólidos.

**keywords**

**air microbiology, hospital, operating room, interior air quality, nosocomial infections**

**abstract**

The complex clinical environment requires a special attention in order to assure a healthy interior air quality. In this manner, health professionals as well as patients can be protected from nosocomial infections and from occupational diseases.

Although the contamination of an operating room is known as being the main responsible of postoperative complications, in Portugal there is still scarce information regarding the composition of the airborne flora of hospital facilities.

The main objective of this investigation is to determine the composition of the airborne flora of an operating room of a District Hospital of the Northeast area of Portugal.

Sampling occurred during one month (July of 2008), twice a week, in a total of 8 samples. The sampling sites were the central point of the orthopaedics operating room and the assessing room (reference site) that is not equipped with an HVAC system.

Additionally, three samples were collected from the Central Sterilisation Unit that is equipped with an Air treatment Unit.

Air sampling was carried out with an airIDEAL® (bioMérieux) impactor using agar specific mediums for bacteria and fungi.

Our results show that the concentration of Colony Forming Units in the operating room is lower than in the reference sampling site. Furthermore, the concentration of bacteria present was seen to be higher than the concentration of airborne fungi. Similar results were obtained in the Central Sterilization Unit.

*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus cohnii cohnii* were the main microorganisms found and no pathogenic organisms were identified. Nevertheless, several of the organisms identified have been described as opportunist pathogens. Relating the antibiotic resistance detected we were able to identify, *Staphylococcus cohnii cohnii* and *Staphylococcus caprae* that exhibited a high level of antibiotic resistance to penicillins and macrolides.

# Índice

<b>1. Introdução</b>	<b>3</b>
1.1. Qualidade do ar interior	3
1.1.1. Contaminantes do Ar Interior	4
1.1.2. Legislação	8
1.2. Qualidade do ar interior em Instalações Hospitalares	11
1.2.1. Infecções Nosocomiais	12
1.2.2. Sistemas AVAC	15
1.2.3. Controlo ambiental	16
<b>2. Objectivos</b>	<b>21</b>
<b>3. Material e métodos</b>	<b>25</b>
3.1. Local de estudo	25
3.2. Meios de cultura	27
3.3. Air Ideal®	28
3.4. Colheitas	29
3.5. Identificação Bacteriana	30
3.6. Avaliação de susceptibilidade a agentes anti-microbianos	31
3.7. Avaliação da presença de enzimas extracelulares	32
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>37</b>
<b>5. Conclusão</b>	<b>61</b>
<b>6. Perspectivas futuras</b>	<b>65</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>69</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>77</b>

## Índice de Figuras

Figura 1.A. - Entradas e saídas de ar da Sala do Bloco Operatório	26
Figura 1.B. – Planta do Serviço de Esterilização	26
Figura 2 - Colheita de aferição	37
Figura 3 – Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m <sup>3</sup> ) no bloco operatório	38
Figura 4 - Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m <sup>3</sup> ) no local de referência	39
Figura 5 - Número de intervenções cirúrgicas ocorridas no bloco operatório	40
Figura 6 - Registo da Humidade no Local 1 (sala de ortopedia) e Local 2 (zona de referência).	41
Figura 7 - Registo da temperatura no Local 1 (sala de ortopedia) e Local 2 (zona de referência)	41
Figura 8 - Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m <sup>3</sup> ) no serviço de esterilização, zona de corredor	42
Figura 9 - Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m <sup>3</sup> ) no serviço de esterilização, zona suja	43
Figura 10 – Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m <sup>3</sup> ) no serviço de esterilização, zona limpa	43
Figura 11 - Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m <sup>3</sup> ) no serviço de esterilização, zona estéril	44
Figura 12 - Registo das temperaturas e humidades observadas nas diferentes zonas do serviço de esterilização. A-Corredor; B-Zona Limpa; C - Zona Suja. D – Zona Estéril.	45
Figura 13 - Distribuição dos isolados nas colheitas 1-4 realizadas na sala do bloco Operatório.	50
Figura 14 - Distribuição dos isolados nas colheitas 5-8 realizadas na sala do bloco Operatório.	51



Figura 15 - Distribuição dos isolados nas colheitas 1-4 realizadas no local de referência	52
Figura 16 - Distribuição dos isolados nas colheitas 5-8 realizadas no local de referência	53
Figura 17 - Distribuição dos isolados nas colheitas 1 – 3 realizadas no Serviço de Esterilização, nas 4 zonas estudadas	54
Figura 18 – Determinação das resistências aos antibióticos	57

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 - Fontes de poluição do ar interior (Fonte: <a href="http://www.apambiente.pt">www.apambiente.pt</a> . 2008)	5
Tabela 2 – Parâmetros previstos pelo Decreto – Lei 79/2006	9
Tabela 3 - Resultados da Identificação dos isolados encontrados	47

## **Lista de Abreviaturas**

AVAC – Aquecimento, ventilação e ar condicionado

SCE – Serviço Central de Esterilização

QAI – Qualidade do Ar Interior

SED – Síndrome do edifício doente

UTA – Unidade de tratamento de ar

TSA – Trypticase soja agar

RBCA – Rose Bengal Cloranfenicol agar

UFC – Unidade formadora de colónia

CMI – Concentração mínima inibitória

PEN - Penicilina

OXA - Oxacilina

ERI - Eritromicina

QDA- Quinopristina - Dalfopristina

CLI - Clindamicina

FOS - Fosfomicina

VAN- Vancomicina

FUC – Ácido Fúsidico

CTX – Cefotaxima

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

### **1.1. Qualidade do ar interior**

Cada vez mais frequentemente vêm a público questões relacionadas com a poluição exterior, nomeadamente no que diz respeito à camada de ozono e aos efeitos que a sua destruição provoca. Ouve-se falar em doenças respiratórias, cancro de pele e um elevado número de mortes crescente de ano para ano devido às emissões de poluentes diárias (Ferreira, 2008). Menos mediáticos, os problemas relacionados com a Qualidade do Ar Interior (QAI) deveriam ter igual relevância pública.

O ar que respiramos nos locais de trabalho, espaços públicos e mesmo em nossas casas pode não ser saudável. Pelo menos não tanto quanto pensamos! E alguns ambientes poderão ser mesmo grandes causadores de perturbações físicas, biológicas e mentais para muitos de nós (Gomes, 2002).

Recentemente as pessoas têm estado cada vez mais atentas a potenciais problemas de conforto e saúde que podem estar associados a uma má qualidade do ar interior. Uma maior consciencialização para problemáticas ambientais também tem dado o seu contributo.

Nos dias de hoje, as pessoas esperam ambientes interiores saudáveis, confortáveis e produtivos. E quem não conhece já a expressão “Síndrome do Edifício Doente (SED)”? O SED refere-se a um conjunto de queixas e desconforto ambiental dos ocupantes de edifícios assim como a um conjunto de sintomas médicos, tais como irritações das membranas mucosas, sintomas do sistema nervoso central, rigidez do tronco, alergias e afecções da pele. Estas afecções são originadas por poluentes de origem química e ainda por microrganismos em suspensão na atmosfera que se designam por bioaerossóis (Gomes, 2002).

### **1.1.1. Contaminantes do Ar Interior**

A contaminação ambiental exterior influencia, directa ou indirectamente, todos os espaços fechados que dia a dia ocupamos (Gomes, 2002). As concentrações de contaminantes do ar ambiente em espaços limitados são, de um modo geral, muito mais elevadas do que as do ar ambiente exterior (Fang *et al*, 2007).

Estima-se que passamos 90% do nosso tempo em ambientes fechados (Gomes, 2006). Os problemas de saúde associados ao ar interior dos edifícios, são factores importantes que justificam inspecções e análises de forma a aferir os índices da qualidade do ar que respiramos no interior dos edifícios.

Os contaminantes que mais se podem encontrar no ar interior são variados, como se pode verificar pela tabela 1. O ambiente interno de qualquer edifício é o resultado da integração da disposição física do edifício, do clima, dos sistemas de aquecimento, ventilação e ar condicionado (AVAC), dos materiais de construção, dos ocupantes, e dos contaminantes existentes no interior e exterior do edifício. A estrutura física do edifício e o seu sistema AVAC determinam o movimento de ar no interior, assim como a quantidade de ar fresco exterior que entra no edifício. Por exemplo, mudando a disposição interna do edifício erguendo paredes, separadores ou colocando outros obstáculos pode-se modificar o padrão de circulação do ar e conduzindo a uma concentração de contaminantes em determinadas áreas.

Os contaminantes, que se podem encontrar no ar, podem ser classificados em cinco categorias, cada uma das quais representando uma larga variedade de poluentes:

- Compostos Orgânicos
- Compostos Inorgânico
- Matéria Particulada
- Contaminantes Biológicos
- Radiação

**Tab.1.** Fontes de poluição do ar interior (Fonte: [www.apambiente.pt](http://www.apambiente.pt). 2008)

<b>Poluentes</b>	<b>Principais fontes</b>	<b>Efeitos na saúde</b>
Formaldeído	Desinfectantes, produtos derivados da madeira, isolantes, pinturas, adesivos, tabaco, têxtil	Irritação olhos, problemas respiratórios
Monóxido de Carbono	Contaminação exterior, combustão incompleta sem exaustão, tabaco	Efeitos agudos, pode levar à morte
Dióxido de azoto	Contaminação exterior, combustão em aquecedores	Problemas respiratórios
Benzeno	Produtos derivados da madeira, fumo de tabaco	Cancerígeno
Naftaleno	Fumo de tabaco, naftalina	Irritação dos olhos, sistema respiratório
Radão (gás radioactivo)	Zonas graníticas	Aumenta risco do cancro do pulmão
Ozono	Contaminação exterior, fotocopiadoras	Problemas respiratórios
Partículas	Contaminação exterior, combustão, AVAC, tabaco, papel	Problemas respiratórios
Dióxido de carbono	Contaminação exterior, tabaco	Afecta sistema nervoso central, sistema cardiovascular, ossos
Bactérias, Fungos	AVAC, materiais de construção e decoração, alcatifa, ocupantes	Alergias e infecções

Os compostos orgânicos são moléculas que contêm ligações carbono-hidrogénio na sua estrutura molecular base, podendo ser de origem natural ou sintética, nomeadamente a partir de petróleo, gás ou carvão. Estes contaminantes orgânicos podem existir sob a forma de gases, líquidos ou partículas sólidas na atmosfera, nos alimentos e na água. Compostos inorgânicos são aqueles que não contêm a ligação carbono-hidrogénio na sua estrutura molecular base. Estão incluídos, entre muitos outros, o dióxido e o monóxido de carbono, o ozono e metais. A matéria particulada é constituída por uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas, com diversas propriedades químicas e físicas. As partículas inaláveis ou finas, cujo diâmetro médio é inferior a 10 microns (PM 10), são frequentemente medidas, já que têm a capacidade de penetrar no sistema respiratório humano (Qualar... [updated 2008]). Neste grupo podemos encontrar os asbestos, pó, esporos, pólen, entre outras toxinas e alergenicos. O edifício moderno tem diversas fontes de energia radiante como campos eléctricos e magnéticos gerados por exemplo por electrodomésticos, computadores e televisores e mais importante pela própria instalação eléctrica. Outras fontes importantes de radiação são fornos de microondas, antenas de telecomunicações, gases do solo ou materiais de construção (como é o caso do radão que é libertado pelo granito).

Os contaminantes biológicos podem ser divididos em três categorias: vírus, bactérias e fungos. As principais fontes de contaminantes biológicos do ar interior encontram-se não só no exterior, mas também nos próprios ambientes interiores. A variedade de compostos biológicos que se podem encontrar num determinado ambiente, pode ser imensa. Assim sendo, a exposição a crescentes concentrações destes agentes cria um enorme risco para a saúde de indivíduos mais susceptíveis.

Os microrganismos existentes no ambiente interior não diferem muito dos existentes no ambiente exterior. Um estudo efectuado (Fang et al, 2007) numa das cidades mais poluídas do mundo, Pequim, mostrou concentrações de bactérias cultiváveis desde 71 UFC/m<sup>3</sup> a 22100 UFC/m<sup>3</sup>. Foram identificadas 165 espécies dos 47 géneros cultiváveis. *Micrococcus* foi o género dominante, seguido por *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas*. A espécie bacteriana que apareceu com maior percentagem foi o *Micrococcus luteus*.

Os microrganismos que ocorrem com maior frequência no ar interior são cocos Gram positivos (*Micrococcus*, *Kocuria*, *Staphylococcus spp.*), bacilos formadores de endósporos (*Bacillus spp.*), bactérias Gram negativas (*Pseudomonas*, *Aeromonas spp.*), fungos filamentosos (*Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*) e leveduras (Górny et al, 2002).

No ambiente hospitalar podem ser encontradas dois tipos de bactérias: bactérias de origem humana (pele, mucosas) entre as quais *Staphylococcus aureus*, enterobacterias ou *Enterococcus*, e bactérias de origem ambiental, das quais algumas apresentam resistências naturais aos antibióticos, nomeadamente bacilos Gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Legionella pneumophila* ou micobactérias atípicas (Fleischer, 2006).

Os efeitos para a saúde humana de uma má qualidade do ar interior, geralmente não são específicos. Contudo, podem-se destacar os seguintes sintomas:

Oculares: conjuntivite, lágrimas, ...

Respiratórios: congestão nasal, rouquidão, secura e dor de garganta, ...

Pulmonares sensação de falta de ar, tosse seca, ...

Dérmicos: alergias, edemas, ...



Gerais: vômitos, náuseas, sonolência, dores de cabeça, irritabilidade e dificuldade de concentração.

Além de todos estes sintomas, podem-se desencadear doenças plenamente definidas como a Doença do Legionário (causada pela *Legionella*), tuberculose, gripe e até mesmo a constipação comum.

O conhecimento da exposição dos trabalhadores aos contaminantes transportados por via aérea é essencial para a saúde ocupacional e para a comissão de higiene e segurança no trabalho, para avaliar os perigos do local de trabalho e proteger os trabalhadores (Eungyoung *et al*, 2006).

### **1.1.2. Legislação**

A Directiva n.º 2002/91/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro, relativa ao desempenho energético, estabelece que “os Estados membros da União Europeia devem implementar um sistema de certificação energética de forma a informar o cidadão sobre a qualidade térmica dos edifícios, aquando da construção, da venda ou do arrendamento dos mesmos, exigindo também que o sistema de certificação abranja igualmente todos os grandes edifícios públicos e edifícios frequentemente visitados pelo público.

As inspecções no âmbito da certificação não se devem, contudo, resumir ao desempenho energético de caldeiras e instalações de ar condicionado. Os sistemas de climatização devem, também, assegurar uma boa qualidade do ar interior, isento de riscos para a saúde pública e potenciador do conforto e da produtividade.

Assim sendo, as inspecções a realizar no âmbito da certificação devem integrar, também, esta componente e, deste modo, contribuir para assegurar a adequada manutenção da qualidade do ar interior, minimizando os riscos de problemas e devolvendo ao público utilizador, a confiança nos ambientes interiores tratados com sistemas de climatização.” (Decreto – Lei 78/2006 e Decreto – Lei 79/2006).

A legislação sobre Certificação Energética e Qualidade do Ar Interior em Portugal, está a ser implementada por fases:

1ª Fase – Com início a 1 Julho de 2007 – Decreto – Lei 78/2006 – SCE (Sistema de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios), que se refere a todos os edifícios novos com mais de 1000 m<sup>2</sup>.

2ª Fase – Com início a 1 Julho de 2007 – Decreto – Lei 78/2006 – SCE (Sistema de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios), que se refere a todos os edifícios novos com menos de 1000 m<sup>2</sup>.

3ª Fase – Com início a 1 Janeiro de 2009 – Decreto – Lei 79/2006 – SCE (Sistema de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios), que se refere a todos os edifícios existentes.

**Tabela 2:** Parâmetros previstos pelo Decreto-lei 79/2006.

Parâmetros	Concentração máxima de referência
Partículas em Suspensão no ar	0,15mg/m <sup>3</sup>
Dióxido de Carbono	1800mg/m <sup>3</sup>
Monóxido de Carbono	12,5mg/m <sup>3</sup>
Ozono	0,2 mg/m <sup>3</sup>
Formaldeído	0,1 mg/m <sup>3</sup>
Compostos Orgânicos Voláteis	0,6 mg/m <sup>3</sup>
Microrganismos – bactérias	500 UFC/m <sup>3</sup>
Microrganismos – fungos	500 UFC/m <sup>3</sup>
<i>Legionella</i> (Se aplicável)	100 UFC/L de água, líquido de refrigeração
Radão (Se aplicável)	400 Bq/m <sup>3</sup>

Esta legislação é o início de algo que é necessário há muito, mas ainda muito básico. Os parâmetros da presente legislação são pouco específicos para muitos edifícios de serviços, particularmente em instalações clínicas e hospitalares. Como por exemplo, um dos parâmetros respeitantes a bactérias da presente legislação considera a presença de 500 colónias de bactérias aceitável. Seria inaceitável mesmo em números muito inferiores a 500 colónias a presença de *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias patogénicas e resistentes a múltiplos antibióticos, numa unidade de queimados ou numa sala de bloco operatório. Como tal, esta legislação não tem qualquer aplicação em instalações hospitalares (Aircontrol... [updated 2008]).

Instituições governamentais internacionais também têm trabalhado no sentido de padronizar o controlo ambiental do ar interior. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através de uma consulta prévia elaborou uma proposta para os indicadores de qualidade do ar ambiental interior em serviços de saúde, na qual o ambiente hospital é dividido em 4 níveis (níveis 0, 1, 2, 3), o nível 0

corresponde à área onde o risco não excede aquele encontrado em ambientes de uso público, aumentando o risco conforme aumenta o nível. Assim para o nível 0 estabelece um limite máximo para contaminantes biológicos de 750 UFC/m<sup>3</sup>, para o nível 1, 500 UFC/m<sup>3</sup>, para o nível 2, 200 UFC/m<sup>3</sup>, para o nível 3 estabelece limite de 50 UFC/m<sup>3</sup> (ANVISA, 2003). Segundo esta proposta o bloco operatório enquadra-se no nível 3.

Em França o limite de microrganismos no bloco operatório é de 5 UFC/m<sup>3</sup> (Ministério da Saúde Francês, 2002), enquanto que no Reino Unido é 35 UFC/m<sup>3</sup>. Outro exemplo é Suíça que coloca como limite máximo 25 UFC/m<sup>3</sup> (Dharan et al, 2002, Landrin et al, 2005).

Estes exemplos sugerem que a legislação existente em Portugal é insuficiente.

## **1.2. A Qualidade do Ar Interior em Instalações Hospitalares**

A qualidade do ar interior nos hospitais, assim como em muitos outros tipos de edifícios, depende dos sistemas AVAC (Aquecimento, ventilação e ar condicionado). Para que as condições ambientais sejam de boa qualidade, é importante que todos os sistemas de climatização sejam adequados e funcionem em condições adequadas. Quando o serviço de manutenção de todo o sistema e equipamento de climatização falha podem ocorrer as seguintes situações:

- Deterioração precoce de todo o equipamento e sistema, com reparações de elevado custo,
- Contaminação biológica do sistema,
- Contaminação ambiental de todas as áreas e equipamento hospitalar,
- Aumento do número de infecções nosocomiais entre os doentes,
- Condições ambientais de trabalho impróprias.

Ao ser efectuada uma análise periódica à qualidade do ar interior, de modo a que se conheçam as condições ambientais existentes, é possível uma melhor manutenção e gestão de todo o sistema de climatização, reduzindo o número de infecções nosocomiais causadas por contaminação ambiental.

A manutenção feita na maioria dos hospitais é insuficiente ou mesmo não existente. Apesar do Decreto-Lei n.º 79/2006, introduzir regras mais específicas para a qualidade do ar interior, pouco impacto tem no respeitante à qualidade do ar interior em unidades hospitalares, já que não apresenta parâmetros específicos no respeitante a áreas críticas hospitalares.

### **1.2.1. Infecções Nosocomiais**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) uma infecção nosocomial, também chamada “infecção adquirida no hospital” ou “infecção hospitalar”, define-se como: uma infecção adquirida no hospital por um doente que foi internado por outra razão que não essa infecção. Ou uma infecção que ocorre num doente internado num hospital, ou noutra instituição de saúde, e que não estava presente, nem em incubação, à data da admissão. Estão incluídas as infecções adquiridas no hospital que se detectam após a alta, assim como infecções ocupacionais nos profissionais de saúde.

As instituições de saúde incluem instituições como clínicas altamente equipadas e hospitais universitários com tecnologias avançadas, assim como unidades com apenas estruturas básicas. Apesar dos progressos na saúde pública e nos cuidados hospitalares, as infecções continuam a surgir nos doentes hospitalizados, podendo mesmo atingir os profissionais de saúde (a equipa hospitalar).

Vários factores favorecem a infecção nestes doentes: a depressão da imunidade; o número, cada vez maior, de procedimentos médicos e técnicas invasivas que criam potenciais portas de entrada para a infecção; hospitais sobrelotados em que as deficientes práticas de controlo da infecção facilitam a transmissão de bactérias multi-resistentes entre os doentes. Outro grupo de factores está relacionado com a qualidade do ar interior, que envolve os sistemas de AVAC e todo o equipamento climatérico dentro das instalações hospitalares, e sistemas de águas.

O ambiente em instalações hospitalares tem um número muito diversificado de microrganismos, mas apenas alguns são considerados patogénicos para indivíduos susceptíveis. Os microrganismos existem em elevado número em ambientes húmidos, mas muitos resistem em condições ambientais secas. A exposição a microrganismos patogénicos em forma de aerossóis constitui o modo de transmissão por contacto directo.

A infecção pode ser transmitida a curtas distâncias através de gotículas e a distâncias maiores através dos núcleos de gotículas produzidas pela tosse ou espirro. Os núcleos de gotículas permanecem no ar por longos períodos e podem ser disseminados largamente num ambiente como um bloco operatório, podendo atingir o doente, directamente ou indirectamente, através de dispositivos médicos contaminados. As actividades hoteleiras, tais como varrer, utilizar esfregonas ou panos secos, ou sacudir a roupa, podem produzir aerossóis com partículas contendo microrganismos.

*Aspergillus* spp. é um fungo causador da aspergilose, que se encontra associado a poeiras ou condições de humidade ambiental em instalações hospitalares.

Outros fungos patogénicos oportunistas que têm estado ocasionalmente ligados a infecções nosocomiais são membros da ordem dos Mucorales (*Rhizopus* spp) e bolores (*Fusarium* spp., *Penicilium* spp.) (Piteira, 2007).

A Tuberculose é provocada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, que é transportada através do núcleo de gotículas com 1 µm-5 µm de diâmetro, causadas por pessoas quando espirram, tosse e falam. Estas partículas podem manter-se em suspensão no meio ambiente por um tempo prolongado.

A colonização de alguns profissionais de saúde por bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* beta-hemolítico grupo A, pode ser uma fonte de muitas infecções nosocomiais. Estes microrganismos são resistentes a ambientes secos e podem persistir no ar ambiente e em superfícies por longos períodos de tempo.

As bactérias Gram negativas necessitam de ambientes húmidos para o seu desenvolvimento, logo raramente estão relacionadas a transmissão através do ar ambiente, com excepção do *Acinetobacter* spp., que tem capacidade de resistir a um ambiente mais seco. Aerossóis provenientes dos chuveiros e torneiras podem conter *Legionella* e outros bacilos Gram negativos existentes na água, tais como *Pseudomonas aeruginosa*.

As gotículas projectadas pelas vias respiratórias infectadas podem também conter vírus, e muitas infecções podem ser transmitidas por esta via, como é o caso de vírus respiratórios, sarampo ou varicela. Na maioria dos casos são transmitidas através de gotículas grandes, e uma dose infectante raramente se move mais do que poucos metros a partir da fonte.

Além dos aerossóis biológicos, existem outro tipo de aerossóis que envolve uma série de outros agentes alérgicos e irritantes. Alguns desses agentes mais comuns incluem formol, óxido de etileno, glutaraldeído, formaldeído, hexaclorofeno, os quais se encontram associados a produtos de limpeza e desinfecção.

### **1.2.3. Sistemas AVAC**

Os sistemas AVAC (aquecimento, ventilação e ar condicionado) em instalações hospitalares são usados para (Piteira, 2007):

- Manter a temperatura e humidade a níveis de conforto para o pessoal, doentes e visitantes;
- Controlar odores;
- Remover o ar condicionado;
- Fazer as mudanças de ar necessárias para proteger o pessoal e os doentes susceptíveis de microrganismos patogénicos, transmitidos pelo meio ambiente, dentro das instalações hospitalares;
- Reduzir o risco de transmissão através do ar ambiente de microrganismos patogénicos de doentes infectados



#### **1.2.4. Controlo Ambiental**

O número de microrganismos no ar depende de inúmeros factores: i) do número de pessoas presentes, ii) do grau e tipo de actividade, iii) da renovação do ar e iv) do grau de humidade. A flora microbiana do ar varia facilmente, logo, a recolha de amostras de ar para controlo da qualidade deste é problemática devido à falta de parâmetros padronizados. Os resultados das amostras devem ser comparados com as amostras de outros espaços, condições e/ou tempos para determinar o significado. Para uma melhor interpretação dos resultados sugere-se que haja uma comparação entre áreas limpas com filtros de alta eficiência e áreas sujas (Piteira, 2007).

Os blocos operatórios modernos, que cumprem os padrões actuais de qualidade do ar, estão virtualmente livres de partículas superiores a  $0,5\mu\text{m}$  na ausência de pessoas na sala. A actividade dos profissionais do bloco operatório é a fonte principal de bactérias no ar, tendo como origem, em primeiro lugar, a pele dos indivíduos presentes na sala.

Actualmente, discute-se a necessidade de um sistema de ventilação específico, principalmente, em algumas especialidades cirúrgicas como a ortopedia, devido ao elevado potencial para infecções. Este tipo de cirurgias utiliza aparelhos giratórios/rotativos, que colocam em suspensão aerossóis de microrganismos contaminado o ambiente da sala.

A recolha de amostras é dependente do ambiente, altura do ano e actividade desenvolvida no local. A escolha do equipamento para a recolha de amostras de ar depende do número de microrganismos existentes (Blomquist, 1994).

Os métodos disponíveis para a recolha de amostras de ar incluem: a sedimentação espontânea, a filtração, a precipitação electrostática, a impactação centrífuga, a impactação em meio líquido e a impactação em meio sólido.

O método de sedimentação espontânea consiste em colocar placas contendo os meios de cultura de escolha, no ambiente a ser estudado, de forma que as partículas dispersas no ar sofram sedimentação pela força da gravidade. O tempo de exposição das placas, que certamente é um factor relevante para o sucesso da técnica, não é padronizado. Esta técnica é extremamente limitada porque não permite a quantificação de microrganismos.

No método de filtração, o ar é forçado a passar por um filtro deixando retidas neste as partículas existentes. Normalmente são usados filtros de policarbonato, acetato de celulose entre outros (Blomquist, 1994). A limitação dos métodos de filtração está relacionada com a possibilidade de ocorrer uma perda da viabilidade das células (Kang and Frank, 1989).

O método da precipitação electrostática tem sido utilizado para retirar partículas do ar baseando-se no princípio de que as partículas possuem carga eléctrica e podem ser atraídas por um campo eléctrico (Morris et al, 1999). Na impactação centrífuga o amostrador usa o princípio da aceleração centrífuga para recolher as partículas para uma superfície com meio de cultura. Estudos efectuados que usaram este método concluíram que é mais eficiente na recolha de partículas com um tamanho superior a 2  $\mu\text{m}$  (Távora et al, 2003).

No método de colisão em meio líquido o ar é bombeado para o interior de um frasco de vidro, passando através de um líquido no qual as partículas ficam suspensas. Este líquido pode sofrer sucessivas diluições para a contagem de bactérias e fungos. Entretanto, possui alguns inconvenientes como o facto de ser feito de vidro, devendo ser esterilizado a cada colheita (Kang e Frank, 1989).

O método mais utilizado é por impactação em meio sólido (Morris et al, 1999), em que o equipamento aspira o ar e lança as partículas directamente em meio de cultura em placas de Petri.

## **2. Objectivos**

Os recursos utilizados para monitorização e controlo da qualidade do ar em ambientes climatizados artificialmente são complexos, de alto custo, e consequentemente de difícil realização para a maioria das instituições hospitalares nacionais. Por outro lado a legislação existente não prevê parâmetros específicos para ambientes hospitalares.

O objectivo deste estudo foi quantificar e investigar a variabilidade de microrganismos num bloco operativo de um hospital.

Teve como objectivos específicos, quantificar o número total de microrganismos existentes no ar (fungos e bactérias), conhecer a variabilidade de bactérias e caracterizar fisiologicamente a flora bacteriana determinando parâmetros como resistência a antibióticos e produção de enzimas hidrolíticas extracelulares.

### 3.1. Local de Estudo

O local de estudo é uma sala do bloco operatório da especialidade de ortopedia de um hospital Distrital localizado na região Nordeste de Portugal. Como local de referência foi utilizada a zona de transferência dos doentes, onde estes são preparados para a cirurgia (figura 1.A.).

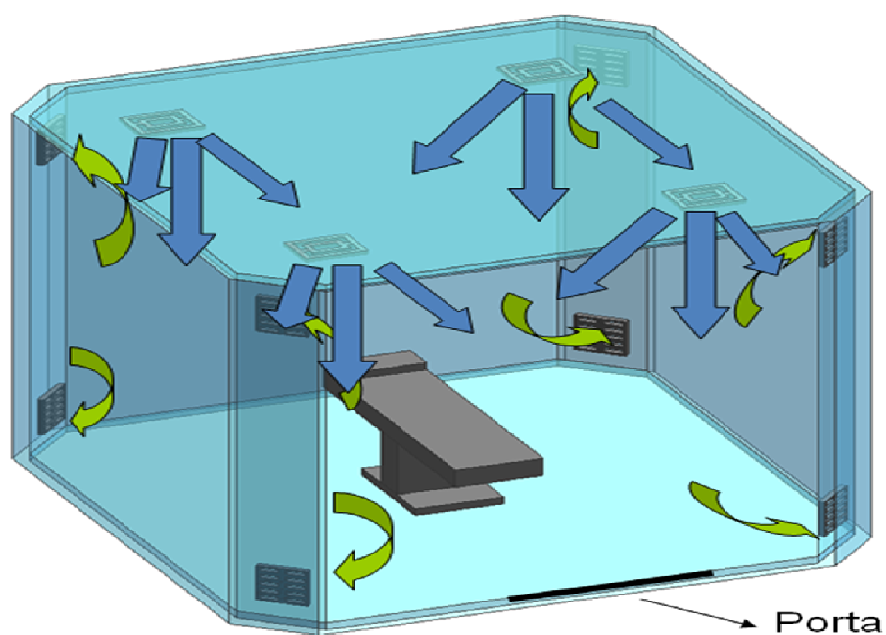
O bloco operatório encontra-se sob pressão positiva em relação às áreas adjacentes, a fim de minimizar a entrada de ar na sala. Usa filtros HEPA de filtragem de alta eficiência, efectuando 15 renovações por hora de ar filtrado com alta eficiência.

Numa segunda fase deste estudo, foram efectuadas colheitas de ar no Serviço Central de Esterilização (SCE). Este Serviço (figura 1.B.) é uma unidade orgânico – funcional de apoio clínico, dotado de autonomia técnica, de recursos materiais e humanos próprios, de forma a realizar, centralmente, isto é, para todos os serviços do Estabelecimento de Saúde em que se integra, as actividades inerentes ao processamento global dos dispositivos médicos (DM) reutilizáveis, quer sejam desinfectados ou esterilizados (DGS, 2001). De acordo com as finalidades e funções, o SCE é constituído pelas seguintes zonas:

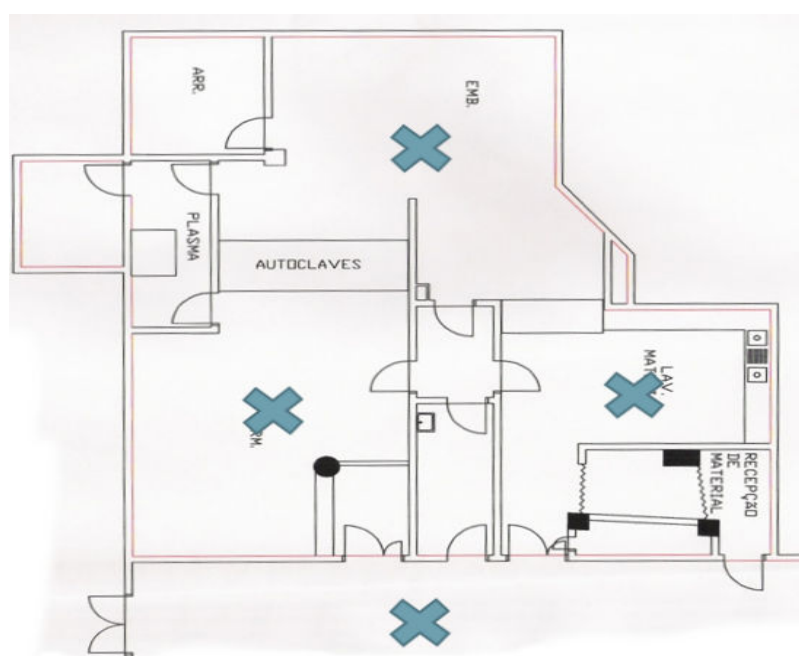
- Descontaminação (zona suja)
- Inspeção, Preparação e Embalagem e Preparação de Têxteis (zona limpa)
- Esterilização e Armazém de Estéreis (zona estéril)

O serviço de esterilização tem como sistema de climatização uma Unidade de Tratamento de Ar (UTA), com duas condutas de ar diferentes, que efectua 8 renovações de ar por hora.

Em todas as zonas foi efectuada a recolha das amostras na parte mais central da divisão.



**Figura 1.A.** Representação esquemática da Sala do Bloco Operatório. As entradas e saídas de ar da Sala do Bloco Operatório encontram-se indicadas na figura.



**Figura 1.B.** Planta do Serviço de Esterilização

### 3.2. Meios de Cultura

Na recolha das amostras de ar foram utilizados dois meios diferentes:

- TSA com 0,2% cicloheximida (TSAC), específico para bactérias (Gangneux *et al*, 2006).
- Rose bengal cloranfenicol (0,1 g.l<sup>-1</sup>) agar (RBCA), específico para fungos (Gangneux *et al*, 2006).

Foram efectuadas 3 réplicas para cada meio, que, após colheita, foram incubadas a 20°C durante 7 dias, efectuando-se 3 contagens, a primeira ao 3º dia, a segunda ao 5º, e a terceira ao 7º dia, de modo a determinar a concentração de microrganismos (UFC/m<sup>3</sup>).

### **3.3. Air IDEAL®**

A utilização do amostrador microbiológico de ar airIDEAL® (bioMérieux), permite efectuar controlos microbiológicos do ar. É um tipo de instrumento impactador baseado no princípio descrito por Anderson (Anderson, 1958). O papel da impactação é separar as partículas do fluxo de ar, fazendo com estas impactem numa placa com meio de cultura. Para que tal ocorra, tem que se acelerar fortemente o fluxo de ar por cima da superfície de impactação. O ar é aspirado através de um crivo composto por um conjunto de 286 orifícios calibrados.

Este equipamento permite recolhas precisas e reprodutíveis de diferentes volumes de ar, que podem ir de 10 até 1000 litros.

Foi efectuada uma correcção estatística após a leitura de UFC, permitindo converter o resultado na quantidade mais provável de microrganismos recolhidos por metro cúbico, para isso, é aplicada a lei de Feller (de acordo com as recomendações do fabricante).



### **3.4. Colheitas**

Foram efectuadas 8 colheitas de ar ao longo de um mês (Julho de 2008), No final das intervenções cirúrgicas marcadas para cada dia, e após desinfectão da sala.

No Serviço de Esterilização foram efectuadas 3 colheitas, durante uma semana.

### **3.5. Identificação Bacteriana**

Após sete dias de incubação todas as colónias morfologicamente diferentes foram isoladas (por repicagem em TSA) de modo a se obterem culturas puras. Posteriormente foi efectuada coloração de Gram (Anexo 1) e o aspecto morfológico foi analisado por microscopia óptica de fundo claro.

Foram efectuados testes preliminares de acordo com o resultado obtido da observação da coloração, para orientação relativamente à identificação e respectivo antibiograma a realizar (determinação da presença de Catalase (Anexo 2), Coagulase (Anexo 2) e Oxidase).

O sistema usado para as identificações, foi o sistema automático VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Inc), que identifica um microrganismo com uma metodologia baseada nas características dos dados e no conhecimento sobre o microrganismo e as reacções analisadas. Para que todo este processo seja possível, foram recolhidos dados suficientes de estirpes conhecidas para se estimarem as reacções típicas das espécies em questão num conjunto de compostos bioquímicos de diferenciação. Se não for reconhecido um padrão único de identificação, é fornecida uma lista de possíveis microrganismos ou a estirpe é determinada como estando fora da capacidade da base de dados.

### **3.6. Avaliação da susceptibilidade a agentes anti-microbianos**

O método usado para realização dos antibiogramas foi o sistema automático VITEK® 2 Compact, e os antibiogramas manuais ATB® Staph (Anexo 3) e ATB® STREP 5 (Anexo 4).

A galeria ATB STREP 5 permite determinar a sensibilidade dos estreptococos e dos pneumococos aos antibióticos em meio semi-sólido em condições muito próximas das técnicas de referência de diluição em gelose ou de micro-diluição (em conformidade com as recomendações do NCCLS). A galeria ATB STAPH 5 permite determinar a sensibilidade dos estafilococcus aos antibióticos.

Os Testes de Sensibilidade aos Antibióticos VITEK® 2 (AST) são essencialmente uma versão miniaturizada e abreviada da técnica de dupla diluição para as CMI determinadas pelo método de microdiluição. Cada carta AST apresenta 64 micropoços. Em todas as cartas existe um poço de controlo, que contém apenas meio de cultura microbiológico, contendo os restantes poços quantidades conhecidas de um antibiótico específico combinado com um meio de cultura. O aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços da carta durante um período de tempo definido. No fim do ciclo de incubação, os valores de CMI são determinados para cada antibiótico contido na carta.

### 3.7. Avaliação da presença de enzimas extracelulares

A capacidade de um microrganismo infectar um hospedeiro de modo a sobreviver como espécie, implica o desenvolvimento de estratégias para ultrapassar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Inúmeras enzimas foram descritas e propostas como factores de virulência do microrganismo. Enzimas com funções completamente opostas são incriminadas como factores de virulência: a coagulase é uma enzima responsável pela promoção da coagulação e é produzida pelo *Staphylococcus aureus*, mais virulento que as outras espécies do mesmo género, as quais não possuem essa enzima (Sousa, 1998). Muitas outras enzimas foram descritas como, por exemplo, proteases, nucleases, collagenases e lipases.

As lipases hidrolisam lípidos e parecem ser necessárias para a invasão da pele e tecido celular subcutâneo. Diversos microrganismos secretam enzimas proteolíticas com especificidade para a IgA (proteases da IgA), a qual tem um papel inibitório da colonização microbiana (Sousa, 2000).

As enzimas em altas concentrações no ambiente estão relacionadas com algumas doenças ocupacionais, tais como, rinite alérgica, conjuntivite ou asma (Baur, 2005).

No estudo da presença das enzimas foram utilizados os seguintes meios:

- TSA com *Skim Milk* (1%, v/v) (Nicodème *et al*, 2005)
- TSA com Tween 20 (1%, m/v) (Nicodème *et al*, 2005)

Após a inoculação as placas foram incubadas a 20, 30 ou 37°C consoante a estirpe em estudo, e os resultados lidos após 24 horas de incubação (para o caso da actividade proteolítica) e 48h (para o caso da actividade lipolítica).

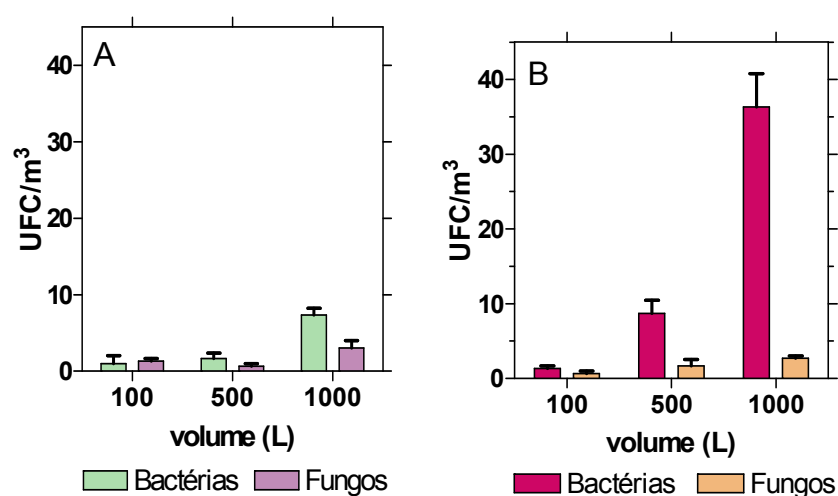
A actividade proteolítica foi detectada visualmente por aparecimento de um halo translúcido, correspondente à hidrólise das caseínas, em volta da colónia em estudo.

A actividade lipolítica foi detectada visualmente por aparecimento de um precipitado (cristais de sais de cálcio formados após hidrólise do substrato, Tween 20) em redor da colónia em estudo.

#### 4. Resultados e Discussão

Antes de se proceder às colheitas, foi efectuada uma colheita de aferição, que teve como objectivo, determinar o volume de ar a recolher (Figura 2). De acordo com os resultados obtidos, determinou-se que para o Local 1 seria recolhido um volume de 1000 litros (Figura 2 A) e para o Local 2 um volume de 500 litros (Figura 2 B). No serviço de Esterilização, foi recolhido um volume de 500 litros por réplica, visto este possuir um sistema de controlo da qualidade do ar semelhante ao existente no local referência do bloco operatório.

Estudos realizados em caso de suspeita de um surto de infecção nosocomial, usando o método de sedimentação em placa, efectuados no mesmo local não revelaram a presença de microrganismos. O método por impactação terá tornado assim o estudo mais rigoroso e eficiente.

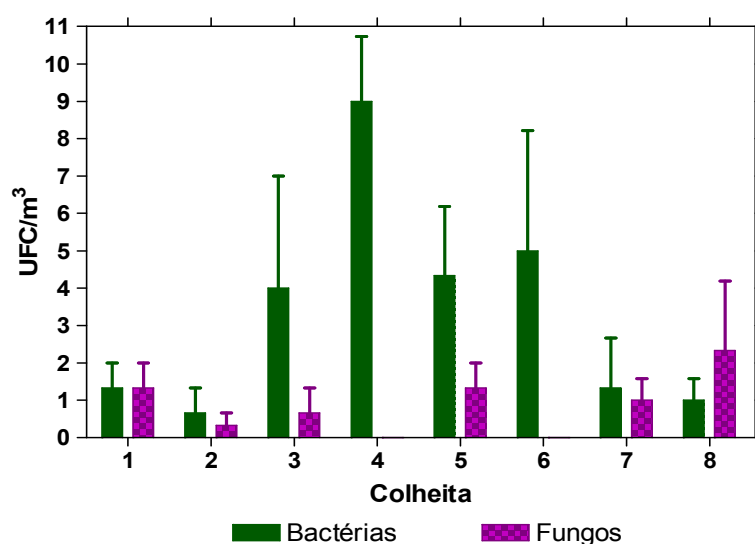


**Figura 2.** Colheita de aferição. Procedeu-se à recolha de volumes crescentes de ar nos locais: A- local 1 (bloco operatório) e B - local 2 (local referência).

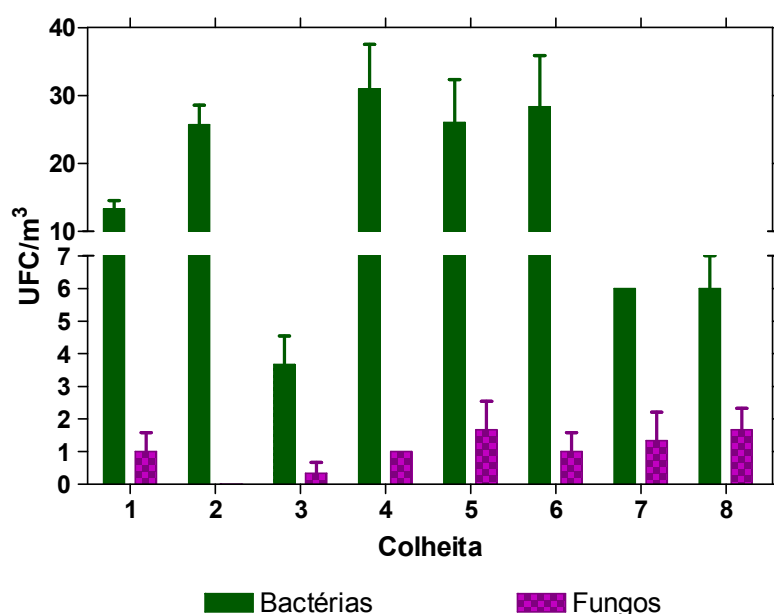
#### 4.1. Concentração de bactérias e fungos

Após a definição do volume de ar que seria colhido, iniciou-se a recolha das amostras, que decorreu durante o mês de Julho de 2008, bissemanalmente, num total de 8 colheitas. No SCE a recolha efectuou-se simultaneamente, durante uma semana no total de 3 colheitas.

Na contagem de UFCs, observou-se existir maior número de unidades formadoras de bactérias do que de unidades formadoras de fungos em todos os locais (Figuras 3 e 4), o que vai de encontro aos resultados obtidos noutros estudos (Fleischer et al, 2006). Verificou-se que o número de microrganismos existentes no ar do bloco operatório era inferior ao número de microrganismos existentes no local de referência, como se pode observar nas Figuras 3 e 4. Este facto deve-se seguramente à existência de um sistema AVAC no bloco operatório. Adicionalmente a este facto, o local de referência é um local de passagem de todos os profissionais do bloco operatório, o que proporciona o aumento de microrganismos existentes.



**Figura 3.** Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m<sup>3</sup>) no bloco operatório.

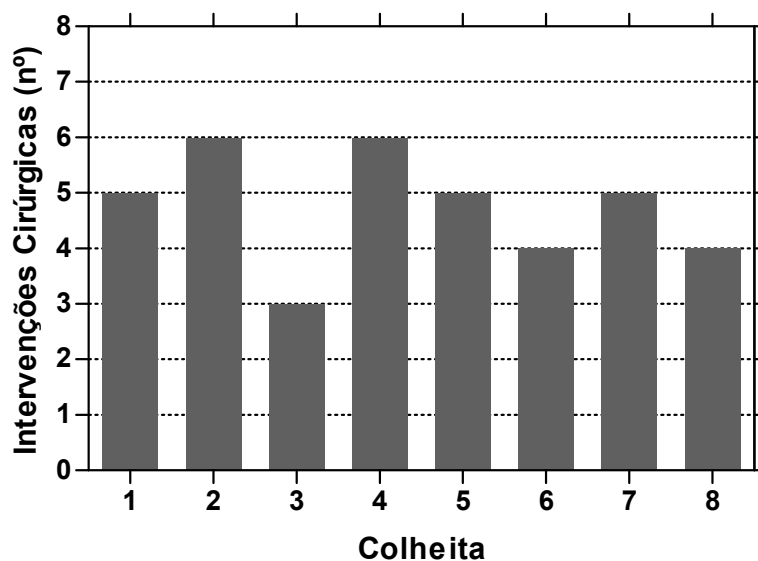


**Figura 4.** Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m<sup>3</sup>) no local de referência.

A concentração encontrada de bactérias e fungos em ambos os locais, encontrou-se dentro dos valores exigidos pela legislação em vigor em Portugal.

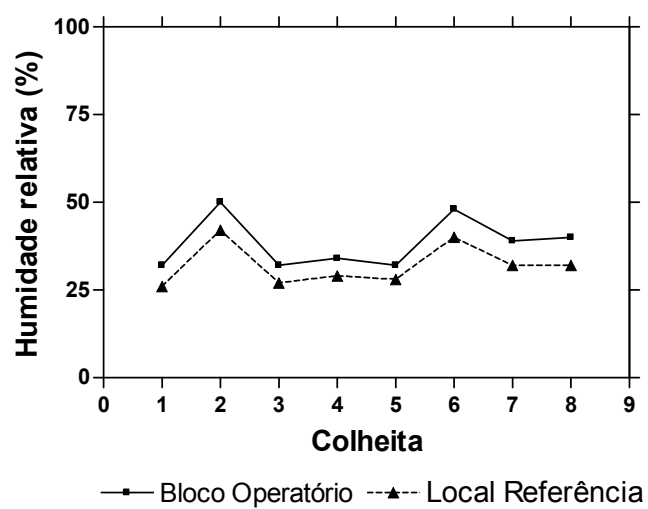
Durante o mês de Julho de 2008 em que decorreram as colheitas o número de intervenções cirúrgicas foi constante, com um número de profissionais participantes também constante. Assim, este parametro parece não ter tido qualquer interferência na variação da concentração de microrganismos presentes no ar do Bloco Operatório (Figura 5).



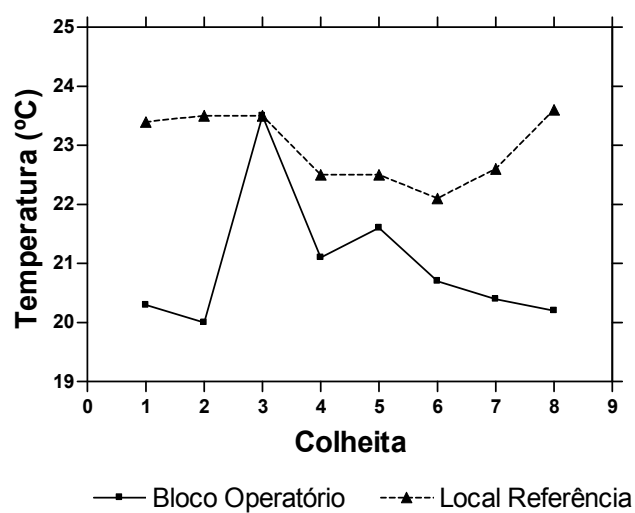


**Figura 5.** Número de intervenções cirúrgicas ocorridas no bloco operatório.

A variação da humidade e da temperatura não registou grandes diferenças ao longo do período de colheita nos dois locais do bloco operatório, como se pode verificar pela observação das figuras 6 e 7, o que parece sugerir que as variações na concentração de microrganismos determinadas não parecem ser dependentes destes parâmetros. Adicionalmente, na terceira colheita observou-se um aumento da temperatura no bloco operatório (figura 7), que aparentemente não influenciou a concentração de microrganismos existentes.

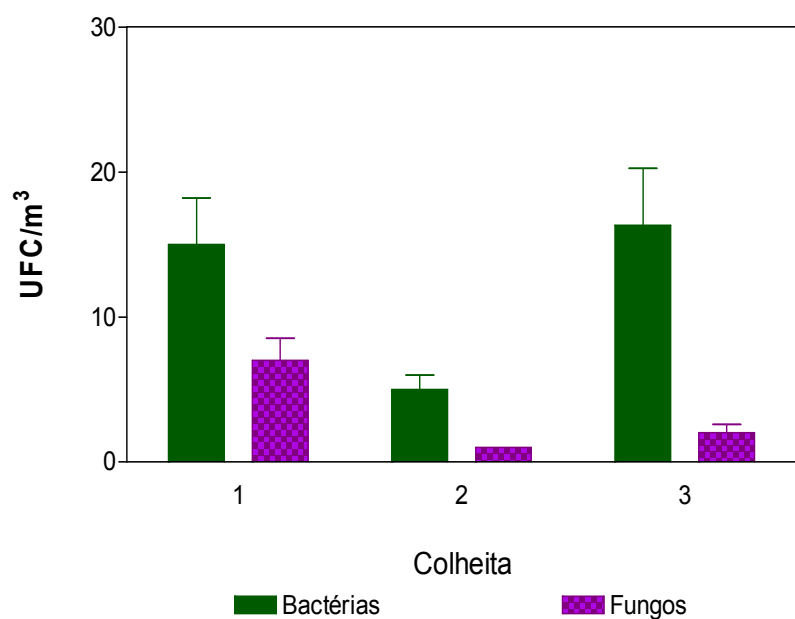


**Figura 6.** Registo da humidade no Local 1 (sala de ortopedia) e Local 2 (local de referência).

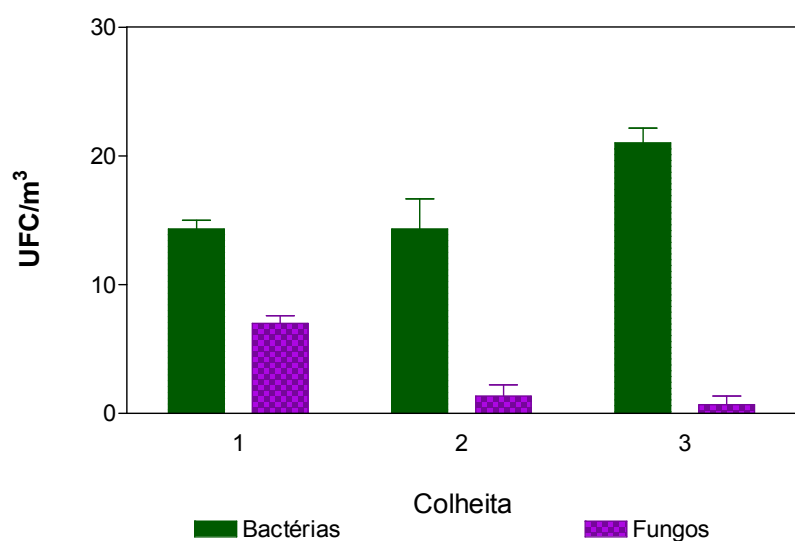


**Figura 7.** Registo da temperatura no Local 1 (sala de ortopedia) e Local 2 (local de referência).

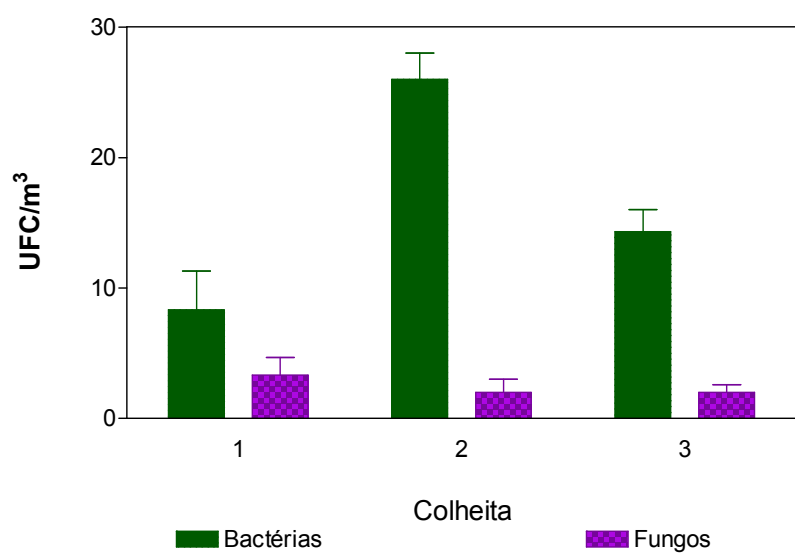
No serviço de esterilização, existe, tal como no bloco operatório, uma concentração de fungos inferior à concentração de bactérias (Figura 8). Na zona suja observa-se um ligeiro aumento da concentração de bactérias ao longo do período de colheita, enquanto que a concentração de fungos diminui (Figura 9). Quanto à zona limpa, enquanto que a concentração de fungos parece não variar ao longo do período de amostragem, a concentração de bactérias aumenta na segunda colheita (Figura 10). Na zona estéril a concentração de fungos é muito variável, havendo um decréscimo significativo ao longo das colheitas (Figura 11). Um factor importante para tal ter ocorrido poderá ter sido a limpeza mensal que ocorreu antes da terceira colheita.



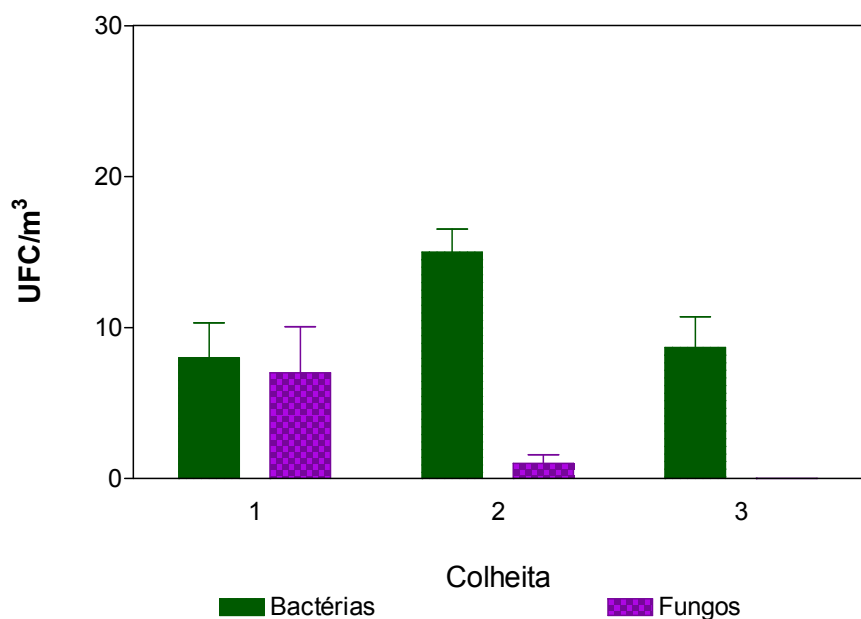
**Figura 8.** Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m<sup>3</sup>) no serviço de esterilização, zona de corredor.



**Figura 9.** Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m<sup>3</sup>) no serviço de esterilização, zona suja.



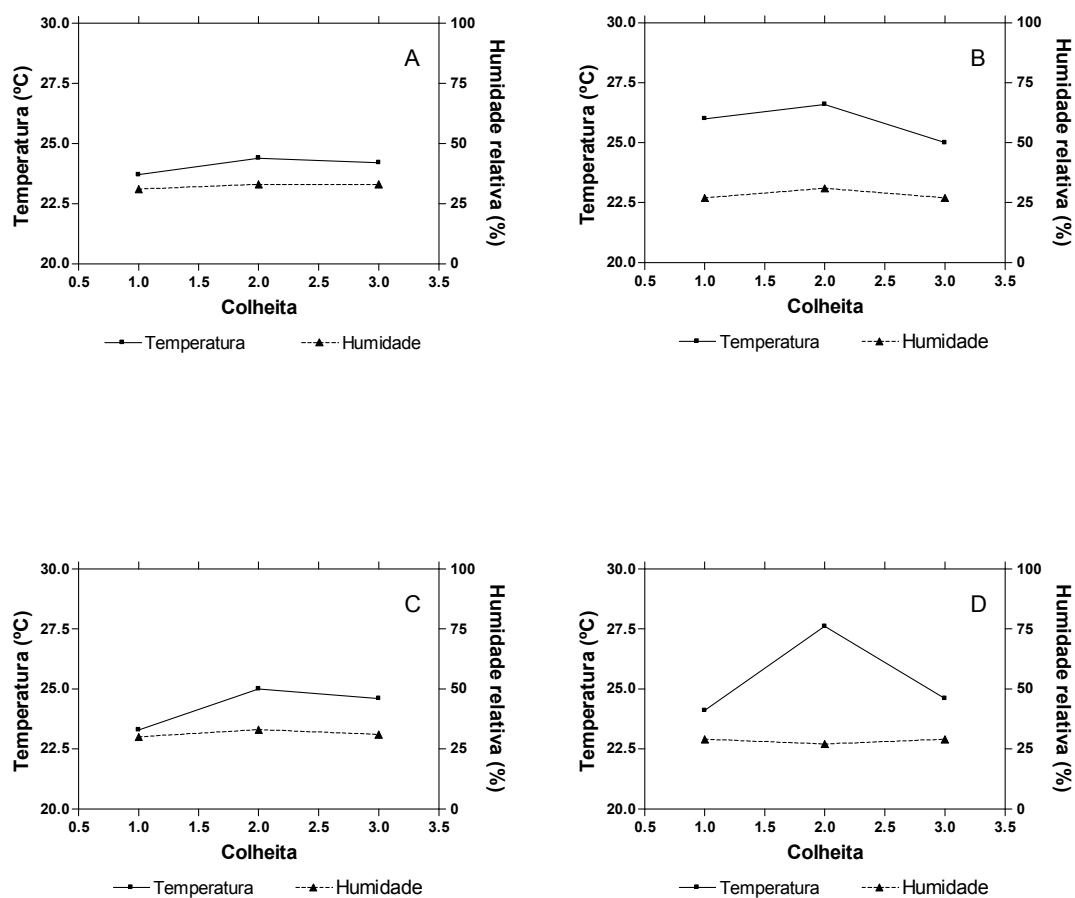
**Figura 10.** Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m<sup>3</sup>) no serviço de esterilização, zona limpa.



**Figura 11.** Determinação da concentração de bactérias e fungos (UFC/m<sup>3</sup>) no serviço de esterilização, zona estéril.

Assim como no bloco operatório, a concentração de bactérias e fungos neste serviço encontra-se dentro dos valores normais exigidos pela legislação em vigor em Portugal.

Relativamente à temperatura nos diferentes locais do serviço de esterilização, foi registado um valor mais elevado na colheita 2, na zona estéril, que é explicado pela abertura de um dos autoclaves no momento da colheita, como se pode verificar pela observação da figura 12-D e que é acompanhado por um aumento da concentração de bactérias. Relativamente ao parâmetro humidade observa-se uma grande homogeneidade entre as diferentes zonas (figura 12).



**Fig. 12.** Registo da temperatura e humidade observadas nas diferentes zonas do serviço de esterilização. A - Corredor; B - Zona Limpa; C - Zona Suja. D – Zona Estéril.

#### **4.2. Identificação bacteriana**

Efectuou-se a identificação de todos os isolados consideradas fenotipicamente diferentes. Para isso, foi registado em primeiro lugar o aspecto macroscópico de todas as colónias obtidas. Em seguida procedeu-se a coloração de Gram, tendo-se verificado que todos os isolados correspondiam a bactérias Gram positivas, com morfologia de coco ou bacilo (tabela 3). Foi também determinada a presença de enzimas tais como a catalase e a coagulase. Verificou-se que a maioria das bactérias era catalase positiva (75%), mas coagulase negativa (100%), como se pode observar na tabela 3.

Tabela 3. Resultados da Identificação dos isolados encontrados

Ref.	Identificação da Colheita		Aspecto macroscópico	Coloração de Gram		Morfologia	Identificação	Catalase	Coagulase	Protease	Lipase	Susceptibilidade a Antibióticos	
												Resistente	Intermediário
1	C1R2L1 – 1		Branca	+		coco	<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i>	Pos	Neg	ND	Neg	PEN, OXA, ERY	QDA
2	C1R3L1 – 2		Amarela	+		coco	<i>Staphylococcus caprae</i>	Pos	Neg	ND	Neg	PEN, OXA, ERY, CLI	
3	C1R3L2 – 1		Amarela	+		Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	ERY	
4	C1R3L2 – 2		Laranja	+		coco	<i>Staphylococcus hominis</i>	Pos	Neg	ND	Neg	ERY, CLI, FOS	
5	C2R3L1 – 1		Branca	+		coco	<i>Staphylococcus hominis</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	FOS	
6	C2R1L2 – 3		Beije	+		coco	<i>Staphylococcus auricularis</i>	Pos	Neg	Pos	Pos	FOS	
7	C2R1L2 – 4		Translúcida	+		coco	<i>Staphylococcus hominis</i>	Pos	Neg	Pos	Pos	FOS	
8	C3R3L1 – 2		Beije	+		coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Pos	Neg	Pos	Neg	Sensível	
9	C3R3L1 – 3		Amarelo claro	+		coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pos	Neg	Pos	Pos	Sensível	
10	C3R3L1 – 4		Branca pequena	+		coco	<i>Kocuria rosea</i>	Pos	Neg	Neg	ND	Sensível	
11	C3R3L2 – 3		Branca pequena	+		coco	<i>Leuconostoc mesenteroides spp</i>	Neg	ND	Neg	Neg	VAN	
12	C4R3L1 – 2		Amarelo claro	+		coco	<i>Kocuria varians</i>	Pos	Neg	Pos	Neg	Sensível	
13	C4R3L1 – 3		Branca	+		coco	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	PEN, FOS	FUC
14	C4R3L2 – 2		Amarelo claro	+		bacilo	<i>Kocuria kristenae</i>	Pos	Neg	Pos	Neg	ERY, CLI	
15	C4R3L2 – 3		Laranja	+		coco	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	Neg	ND	Neg	Pos	CLI	PEN
16	C5R2L2 – 5		Amarelo claro	+		coco	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	Sensível	
17	C6R1L1 – 3		Beije	+		bacilo	<i>Gemella morbillorum</i>	Neg	ND	ND	Neg	ND	
18	C6R3L2 – 1		Vermelho	+		bacilo	<i>Erysipelatrix rhusiopathiae</i>	Neg	ND	Pos	Pos	ND	
19	C8R1L1 – 1		Branco	+		coco	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	ERY, CLI, FOS	
20	C8R3L2 – 3		Branco	+		coco	<i>Aerococcus viridans</i>	Neg	ND	Pos	Neg	ERY, CLI	



## Resultados e Discussão

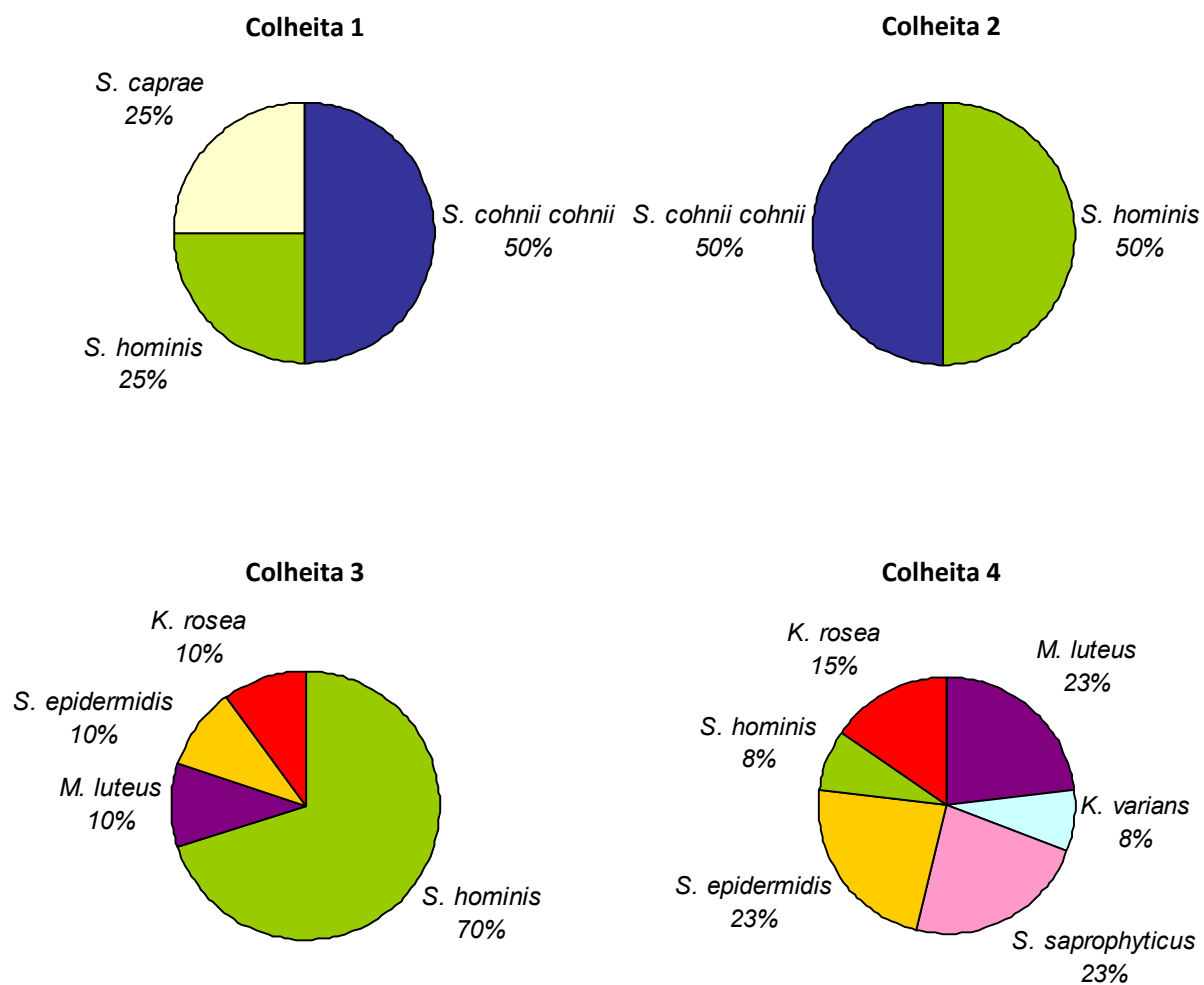
21	C1ZL – 1	Amarelo	+	coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	Sensível	
22	C1ZL – 2	Branco	+	coco	<i>Aerococcus viridans</i>	Neg	ND	ND	Neg	CTX, ERY	
23	C1ZL – 3	Translúcida	+	coco	<i>Kocuria rósea</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	ERY	
24	C1ZL – 5	Beije pequena	+	coco	<i>Alloiococcus otitis</i>	Neg	ND	ND	Pos	PEN, CTX, ERY	
25	C1ZE – 1	Laranja	+	coco	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	Neg	ND	ND	Neg	Sensível	
26	C1ZE – 3	Beije cremosa	+	bacilo	<i>Kocuria rósea</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	FUC	
27	C1ZE – 4	Branca	+	coco	<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i>	Pos	Neg	ND	Neg	ERY, FUC	
28	C1ZR – 1	Laranja	+	bacilo	<i>Kocuria kristenae</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	ERY, FOS	
29	C1ZR – 2	Amarela	+	coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pos	Neg	Pos	Neg	Sensível	
30	C1ZS – 3	Amarelo	+	coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Pos	Neg	ND	ND	ERY, FUC	
31	C2ZC – 2	Branco	+	coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pos	Neg	Neg	Pos	PEN, FOS, FUC	
32	C2ZC – 3	Beije	+	coco	<i>Staphylococcus hominis</i>	Pos	Neg	Pos	Neg	Sensível	
33	C2ZL – 2	Amarelo claro	+	coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	FUC	
34	C2ZE – 1	Laranja	+	bacilo	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	Neg	ND	Neg	Pos	Sensível	
35	C3ZC – 1	Laranja	+	bacilo	<i>Kocuria varians</i>	Pos	Neg	Pos	Neg	ERY	
36	C3ZC – 3	Branca pequena	+	coco	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Pos	Neg	Pos	Neg	Sensível	
37	C3ZS – 2	Branca pequena	+	coco	<i>Staphylococcus hominis</i>	Pos	Neg	ND	ND	ERY, FOS	FUC
38	C3ZL – 1	Amarelo	+	coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Pos	Neg	Pos	Neg		ERY
39	C3ZE – 1	Laranja	+	coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	FUC	ERY
40	C3ZE – 2	Branca pequena	+	coco	<i>Leuconostoc mesenteroides spp</i>	Neg	ND	Pos	Neg	VAN	

Pos – Positivo; Neg – Negativo; ND – não determinado; PEN – Penicilina; OXA – Oxacilina; ERY – Eritromicina; QDA – Quinupristina-Dalfopristina; CLI – Clindamicina; Fos – Fosfomicina; VAN – vancomicina; CTX – Cefotaxima; FUC – Ácido Fusídico

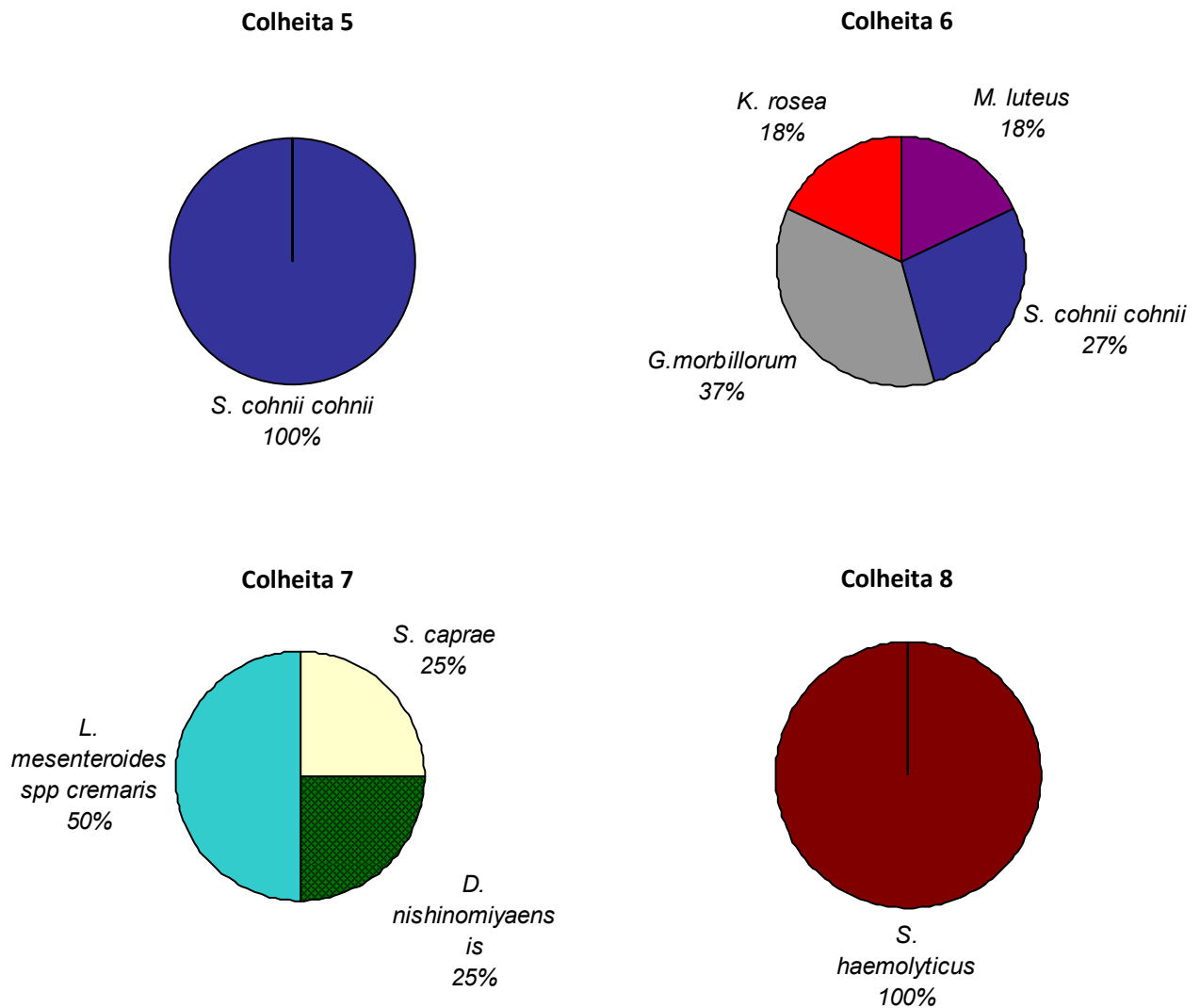
Neste estudo não foi identificado nenhum isolado reconhecidamente patogénica. As espécies bacterianas patogénicas que aparecem com mais frequência no ar são: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter lwoffii*. Algumas destas espécies só são identificadas em estudos que utilizam o airIDEAL como meio de colheita de ar (Fleischer et al, 2006).

No presente estudo, nas 8 colheitas efectuadas no bloco operatório e o correspondente local de referência, observa-se o predomínio ao longo do tempo de 3 isolados da espécie (figuras 13-16), *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus cohnii cohnii*, ocorrendo o mesmo no serviço de Esterilização, como se pode observar na figura 17.

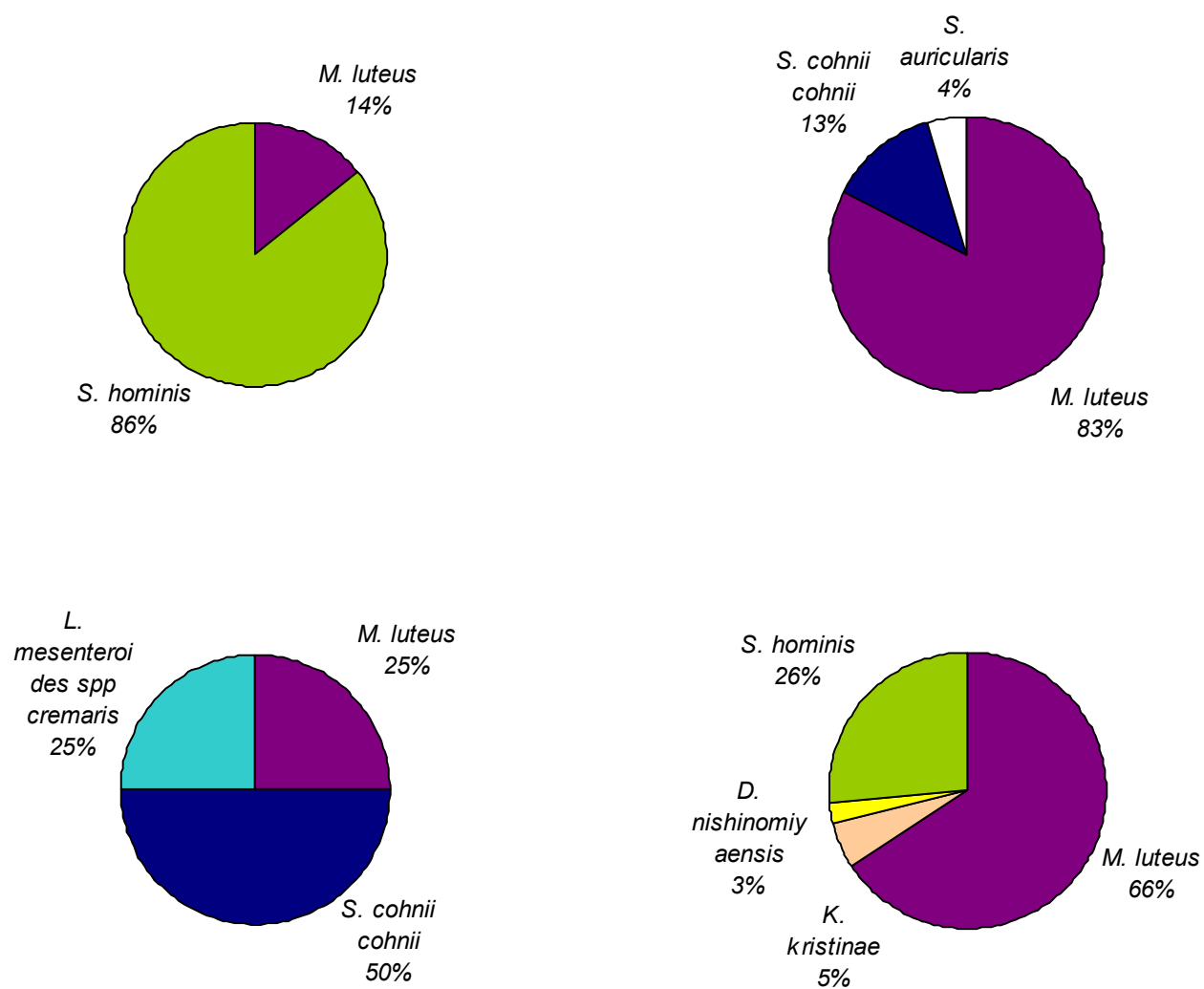
Observou-se ainda que apesar do predomínio destes isolados ao longo do tempo de colheita não foram identificados isolados residentes em nenhum dos locais em estudo. Por outro lado foram identificados representantes do género *Staphylococcus* em todas as colheitas efectuadas no bloco operatório e seu local de referência (figuras 13-16), assim como em todas as colheitas efectuadas em todos os locais do Serviço de Esterilização.



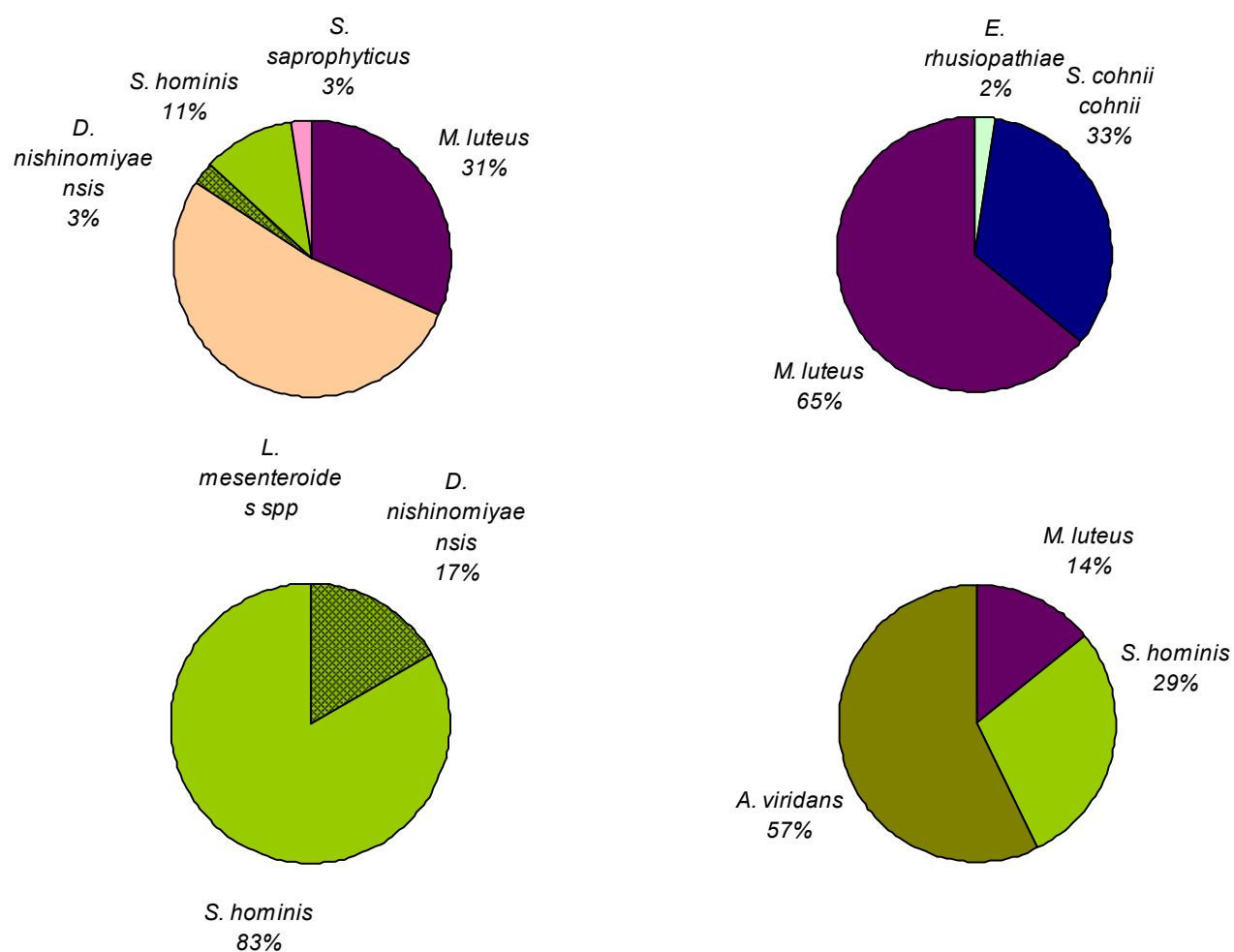
**Figura 13.** Distribuição dos isolados nas colheitas 1-4 realizadas na sala do bloco Operatório.



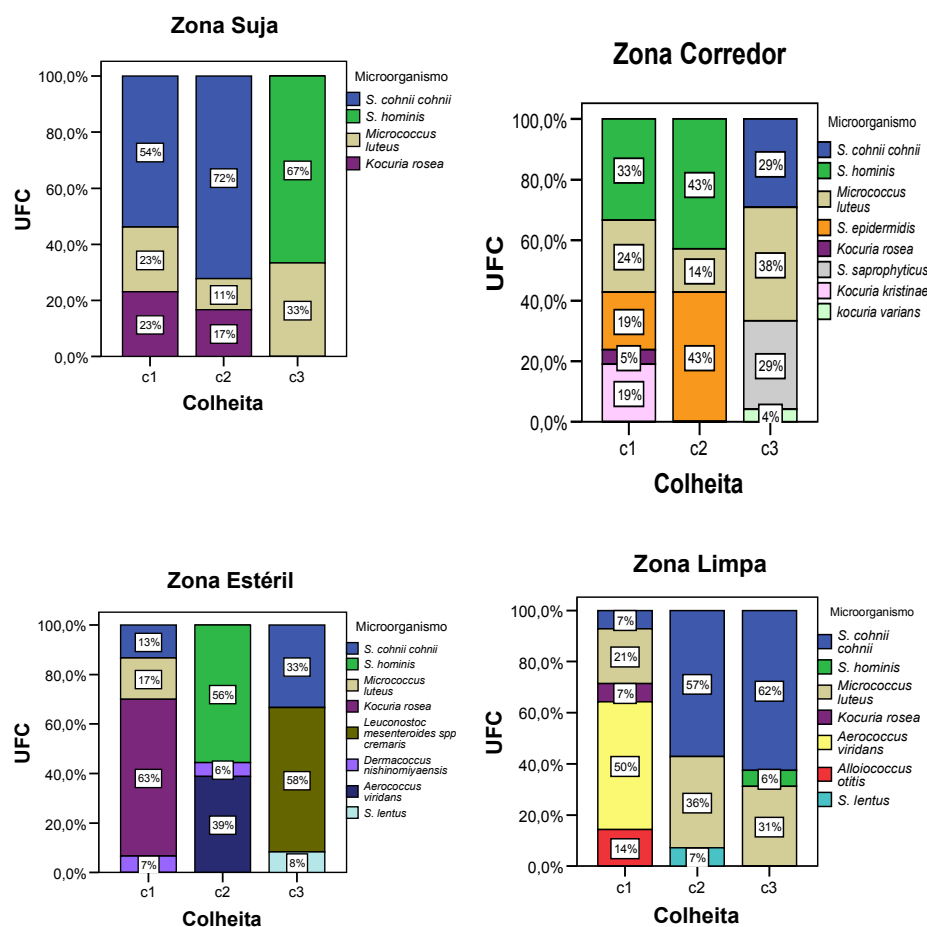
**Figura 14.** Distribuição dos isolados nas colheitas 5-8 realizadas na sala do bloco Operatório.



**Figura 15.** Distribuição dos isolados nas colheitas 1-4 realizadas no local de referência.



**Figura 16.** Distribuição dos isolados nas colheitas 5-8 realizadas no local de referência.



**Figura 17.** Distribuição dos isolados nas colheitas 1-3 realizadas no serviço de esterilização, nas 4 zonas estudadas.

Em hospedeiros debilitados, o *Staphylococcus epidermidis* e outros *Staphylococcus* coagulase – negativos, podem ser responsáveis por infecções diversificadas e graves. As situações que ocorrem mais frequentemente, incluem infecções relacionadas com a presença de corpos estranhos, como próteses, cateteres (Ponce de Leon, 1984 e Stillman, 1987), logo a existência destes microrganismos em bloco operatório de ortopedia, pode comprometer a aceitação da prótese por parte do doente, ou induzir a ocorrência de septicemias.

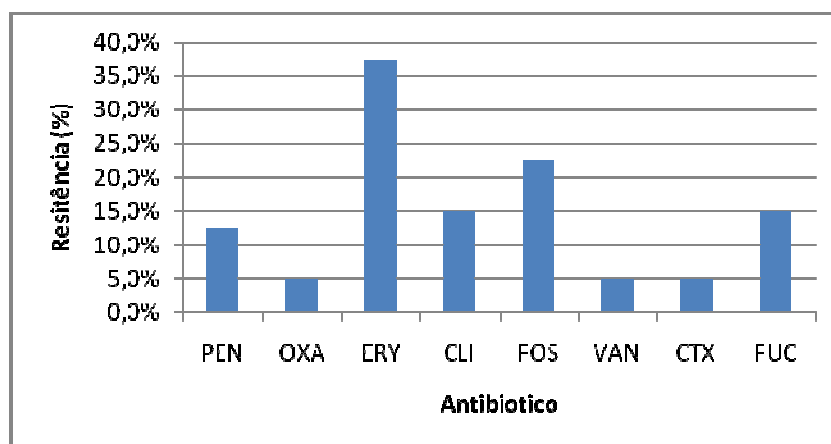
*Erysipelothrix rhusiopathiae* tem sido descrito como agente causador de doenças em animais (suínos), bem como doenças da pele (erisipela), endocardites, septicemias e artrites e podem ser transmitidas ao Homem por contacto directo. A maioria das estirpes é susceptível à penicilina, ampicilina, ciprofloxacina e ao imipenemo (Sousa, 2000). Não é comum identificar esta estirpe a nível hospitalar, ou seja, é uma estirpe com origem na comunidade. Tendo em conta que, no presente estudo, esta estirpe foi encontrada na colheita 6 do local referência do bloco operatório poder-se-á especular sobre uma possível contaminação deste local com produtos de origem externa ao hospital ou sobre a existência de um sistema de limpeza pouco eficiente. Não foi no entanto efectuado um estudo de pesquisa sobre a origem da contaminação, pelo que quaisquer conclusões são apenas especulativas.

Alguns dos microrganismos identificados neste estudo podem ser identificados de forma incorrecta, como é caso da *Gemella morbillorum*, que pode ser identificada como *Neisseria* spp. ou *Streptococcus viridans*. Os poucos casos descritos de infecção com *Gemella morbillorum* foram de infecções endovasculares e peritonites (Azap, 2005).



Os géneros *Micrococcus* e *Bacillus* dominam frequentemente a fracção cultivável existente no ar, mas quando o método de identificação dos microrganismos do ar se baseia em métodos independentes de cultura como a análise de rDNA 16s, os resultados são bem diferentes havendo um aumento nas bactérias Gram negativas, e o género *Micrococcus* aparece como sendo por vezes 2% das sequências bacterianas (Fierer et al, 2008 e Tringe et al, 2008). A influência destes resultados tem especial relevância em termos de saúde pública, já que dentro desta população não-cultivável, poder-se-ão encontrar patogénicos significativos, assim como alérgenos.

No presente estudo verificou-se que o antibiótico que apresenta um maior número de resistências é a eritromicina (figura 18). Os macrólidos são antibióticos que actuam por inibição da síntese proteica, sendo bactericidas quando utilizados em doses altas. São activos contra numerosos cocos e bacilos Gram + e contra alguns cocos e bacilos Gram - incluindo o *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Brucella*, *Mycoplasma pneumoniae* e outros. *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* são resistentes. Os macrólidos são úteis no tratamento de infecções causadas por estreptococos e enterococos constituindo uma alternativa às penicilinas bem como nas infecções respiratórias causadas por *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* ou *Legionella pneumophila* (primeira escolha) e infecções devidas a espiroquetas. A claritromicina e azitromicina são ainda activas contra o *Mycobacterium avium*. A claritromicina é ligeiramente mais activa do que a eritromicina e atinge concentrações tecidulares mais elevadas. A azitromicina é ligeiramente menos activa do que a eritromicina contra Gram + e ligeiramente mais activa contra alguns Gram – (Infarmed).



**Figura 18.** Determinação das resistências aos antibióticos.

As estirpes com maior número de resistências, são as estirpes com as referências 1 e 2 (*Staphylococcus cohnii cohnii* e *Staphylococcus caprae*). Esta associação de resistências é característica de *Staphylococcus* resistentes à meticilina. Apesar deste tipo de resistências ser mais preocupante na estirpe *Staphylococcus aureus*, não a podemos desvalorizar, já que pode ocorrer uma infecção localizada com *Staphylococcus* coagulase negativa, e se estes apresentarem um grande perfil de resistências poderá ser mais difícil de erradicar a infecção. Estas estirpes com este elevado grau de resistência poderão ainda, através da transferência horizontal de genes, passar estas resistências para estirpes sensíveis. O crescimento da resistência aos antibióticos por parte das bactérias é, na maior parte das vezes, devido à disseminação de genes resistentes aos antibióticos por transferência horizontal do gene, mediada por plasmídeos, transposões, integrões e cassetes genéticas de resistência. As cassetes codificam a resistência a um elevado número de antibióticos, nomeadamente a  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, trimetopim, sulfonamidas, tetraciclina, macrólidos, rifampicina e quinolonas (Sousa, 2005).

A resistência à metilina por parte dos *Staphylococcus*, deve-se à expressão da proteína PBP2a codificada pelo gene *mecA*, que se encontra numa cassete genética (SCC – *staphylococcal cassette chromosome*) (Hanssen, 2004).

Dentro do género *Micrococcus* e *Kocuria* ocorrem o maior número de resistências a nível da ampicilina e eritromicina (Szczerba, 2003) Dentro das estirpes identificadas destes dois géneros, observou-se unicamente resistência à eritromicina

A presença de enzimas extracelulares é um dos factores de virulência das estirpes. Neste estudo, as estirpes onde foi detectada a sua presença, são na sua maioria pertencentes à flora comensal da pele e mucosas, logo este é mais um factor que irá facilitar uma possível invasão por parte destes microrganismos.

## 5. Conclusão

O objectivo de um sistema de climatização AVAC num bloco operatório é manter este último sem microrganismos, partículas, e manter os níveis certos de temperatura e humidade. Em ambos os locais caracterizados, a comunidade bacteriana parece ser muito semelhante. Não tendo sido identificada nenhuma estirpe patogénica, podemos concluir que todo o processo que vai desde a limpeza a manutenção dos circuitos de climatização tem sido suficientemente eficientes.

A concentração de bactérias e fungos encontradas neste estudo encontrava-se dentro dos limites normais exigidos pela legislação de Portugal, a qual não refere parâmetros específicos para instituições hospitalares. Os mesmos resultados em países como a França ou Reino Unido, já não são aceitáveis. Sendo assim, torna-se necessário a realização de mais estudos dentro desta área, para possibilitar a realização de uma legislação mais específica para monitorização microbiológica em ambientes hospitalares

A caracterização do perfil de resistências a antibióticos de um microrganismo é importante porque mesmo que não se trate uma bactéria patogénica, poderá tornar-se em patogénica oportunista. Por outro lado o fenómeno de transferência horizontal de genes reveste-se de especial importância em ambientes hospitalares aumentando assim a relevância de estudos que identifiquem os microrganismos existentes as resistências que estes apresentam. Este demonstrou resistências importantes em *Staphylococcus coagulase negativo*, que ao ocorrer tal fenómeno, poderá mesmo, transmitir o mesmo tipo de resistências para estirpes que existem na flora da pele tanto dos doentes como para os próprios funcionários, o que em caso de ocorrer uma deficiência na imunidade, poderá provocar infecções localizadas ou disseminadas.

A realização de monitorizações periódicas de um ambiente hospitalar, em que se identificam os microrganismos existentes, poderão revelar-se extremamente pertinente em caso de surto de uma infecção nosocomial, permitindo identificar a origem do problema.

## 6. Perspectivas Futuras

A vigilância epidemiológica de surtos de infecções nosocomiais em 2009, passará a ser controlada por rigorosos sistemas informáticos. Assim, os resultados obtidos neste estudo irão permitir uma reavaliação do actual método de recolha das amostras de ar existente a nível hospitalar.

Após a realização deste trabalho, considera-se que a realização periódica da monitorização e caracterização bacteriana em ambientes hospitalares deveria ser uma tarefa de rotina. Adicionalmente este tipo de estudos deveria englobar mais serviços e áreas hospitalares de modo a se obter uma imagem mais completa da comunidade microbiana existente, nomeadamente em áreas que poderão representar um risco acrescido para os doentes, nomeadamente, os serviços de Pneumologia e Unidade de Cuidados intensivos.

Por último considera-se que para além da quantificação de fungos realizada neste estudo seria benéfico efectuar a sua caracterização, identificando que estirpes se encontram presentes.

## 7. Referências Bibliográficas

**Anderson, A.** (1958). New samplers for the collection, sizing and enumeration of viable air borne particles. *Inf Bacteriol* 76: 471-484.

**ANVISA** Brasil, Ministério da Saúde (2003). [Updated 2008 Nov 5]. Consulta Pública nº 109, de 11 de Dezembro de 2003. Proposta de Resolução que Dispõe sobre Indicadores de Qualidade do Ar Ambiental Interior em Serviços de Saúde. Available from: [http://www.anvisa.gov.br/scriptsweb/consulta\\_publica/consultas\\_paginado](http://www.anvisa.gov.br/scriptsweb/consulta_publica/consultas_paginado).

**Ardiagnostic** [Internet]. [updated 2008 Oct 20]. Available from: [http://www.ardidagnostic.pt/qualarint\\_text.html](http://www.ardidagnostic.pt/qualarint_text.html).

**Azap, O. K., G. Yapar, F. Timurkaynak, H. Arslan, S. Sezer** (2005). *Gemella morbillorum* peritonitis in a patient being treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*; 20: 854.

**Baur, X** (2005). Enzymes as occupational and environmental respiratory sensitizers. *Int Arch Occup Environ Health* 78: 279–286.

**Biomérieux**. Aplicações Bio-Farmacêuticas. 2006 bioMérieux S.A.

**Blomquist, G.** (1994). Sampling of biological particles. *Analyst*; 119(1): 53 – 56.

**Dharan, S. e D. Pittet** (2002). Environmental controls in operating theatres. *Journal of Hospital Infection*; 51: 79-84.

**Direcção geral de Saúde** (2001). Manual de normas e procedimentos para um serviço central de esterilização em estabelecimentos de Saúde: Central de Esterilização.

**Fang, Z., Z. Ouyang, H. Zheng, X. Wang e L. Hu** (2007). Culturable Airborne Bacteria in Outdoor Environments in Beijing, China. *Springer Science + Business Media*, Volume 54, 487–496.

**Ferreira, C.P.** (2008). Hospitais, entre o céu e o inferno. *Tecno hospital*; 30: 12 – 14.

**Fierer, N., Z. Liu, M. Rodríguez-Hernández, R. Knight, M. Henn, e M. T. Hernández** (2008). Short-Term Temporal Variability in Airborne Bacterial and Fungal Populations. *Applied and environmental microbiology*, p. 200–207, Vol. 74, No. 1.

**Fleischer, M., B. Bober-Gheek, O. Bortkiewicz, J. Rusiecka-Ziółkowska** (2006). Microbiological Control of Airborne Contamination in Hospitals. *Indoor Build Environ*; 15; 1:53–56.



**Gangneux, Jean-Pierre, F. Robert-Gangneux, G. Gicquel, Jean-Jacques Tanquerel, S. Chevrier, M. Poisson; M. Aupe'e, e C. Guiguen (2006).** Bacterial and Fungal Counts in Hospital Air: Comparative Yields for 4 Sieve Impactor Air Samplers with 2 Culture Media. *Infection control and hospital epidemiology*, vol. 27, no. 12.

**Gomes, J. F. P (2002).** Contaminação do ar interior por bioaerossóis. *Rev port pneumol* VIII (6): 689-694.

**Górny, R.L. e J. Dutkiewicz (2002).** Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries. *Ann Agric Environ Med*; 9: 17 – 23.

**Hanssen, A.M., G. Kjeldsen e J. Ericson Sollid (2004).** Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 48: 285 – 296.

**Kang, Y.J, Frank, J.F (1989).** Comparison of airborne microflora collected by the Andersen sieve sampler in a dairy processing plant. *J. Food Prot.*, 52: 887-880.

**Landrin, A., A. Bissery, e G. Kac (2005).** Monitoring air sampling in operating theatres: can particle counting replace microbiological sampling? *Journal of Hospital Infection* 61, 27–29.

**Ministério das obras públicas, transportes e comunicações.** O Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios.2416 *DIÁRIO DA REPÚBLICA— I SÉRIE-A N.º 67— 4 de Abril de 2006.*

**Ministério da Saúde Francês** (2002). Surveillance microbiologique de l' environnemente dans les établissements de santé. Air, eaux et surfaces. p 77.

**Morris, G.; Kokki, M.; Richardson, M (1999).** Methods for sampling *Aspergillus* Sporesinair. Disponível em:<http://www.aspergillus.man.ac.uk>.

**Nicodeme, M., J.-P. Grill, G. Humbert and J.-L. Gaillard** (2005). Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 641–648.

**Piteira C.** 2007. A Qualidade do Ar Interior em Instalações Hospitalares. Lisboa. Lidel – Edições Técnicas.

**Ponce de Leon, S. e R.P. Wenzel** (1984). Hospital acquired bloodstream infections with *Staphylococcus epidermidis*: review of 100 cases. *Am. J. Med.*; 11: 639 – 644.

**QualAr** [Internet]. [updated 2008]. Available from: <http://www.qualar.org/Index.PHP>.

**Rapidmicrobiology** [Internet]. [updated 2008 Oct 12]. Available from: <http://www.rapidmicrobiology.com/test-methods/Air-Samplers.php>.

**Sousa JC.** 2000. Microbiologia, vol 2. Lisboa. Lidel – edições Técnicas. p. 43 – 67.

**Sousa JC.** 2005. Manual de Antibióticos Antibacterianos. Porto. Edições Universidade Fernando Pessoa. p. 671 – 685.

**Stetzenbach, L. D, M. P Buttner e P. Cruz** (2004). Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology*; 15:170–174.

**Stillman, R.I., R.P. Wenzel e L.C. Donowitz** (1987). Emergence of coagulase negative staphylococci as major nosocomial bloodstream pathogens. *Infect. Control*; 8: 108 – 112.

**Szczerba, I.** Susceptibility to antibiotics of bacteria from genera *Micrococcus*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Kytococcus* and *Dermacoccus*. *Med Dosw Mikrobiol.*;55(1):75-80.

**Talon, D., T. Schoenleber, X. Bertrand, e P. Vichard** (2006). Performances of different types of airflow system in operating theatre. *Annales de chirurgie*; 13, 316 – 321.

**Távora, L.G.F., W. Gambale, E.M. Heins-Vaccari, G.L.H. Arriagada, C.S. Lacaz, C.R. Santos, e A.S. Levin** (2003). Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 36: 613-616.

**Tringe, S. G., T. Zhang, X. Liu, Y. Yu, W. H. Lee, J. Yap, F. Yao, S. T. Suan, S. K. Ing, M. Haynes, F. Rohwer, C. L. Wei, P. Tan, J. Bristow, E. M. Rubin, e Y. Ruan** (2008). The Airborne Metagenome in an Indoor Urban Environment. *PLOS One* 3(4): e1862.

**Walter, M. V., B. Marthi, V. P. Fieland, e I. M. Ganio** (1990). Effect of Aerosolization on Subsequent Bacterial Survival. *Applied and environmental microbiology*; 56, 3468-3472.

**Wilson, P** (2007). Is Natural Ventilation a Useful Tool to Prevent the Airborne Spread of TB? *PLoS Medicine*, vol 4.

**Wilson, S. C., J. Morrow-Tesch, D. C. Straus, J. D. Cooley, W. C. Wong, F. M. Mitlohner, e J. J. McGlone** (2002). Airborne Microbial Flora in a Cattle Feedlot. *Applied and environmental microbiology*; 68, 3238–3242, No. 7.

**Wong, K. C., e K. S. Leung** (2004). Transmission and Prevention of Occupational Infections in Orthopaedic Surgeons. *J Bone Joint Surg Am.*; 86: 1065-1076.

**Y. Rao, Carol, M. A. Riggs, G. L. Chew, M. L. Muilenberg, P. S. Thorne, D. Van Sickle, K. H. Dunn, e C. Brown** (2007). Characterization of Airborne Molds, Endotoxins, and Glucans in Homes in New Orleans after Hurricanes Katrina and Rita. *Applied and environmental microbiology*; 73, 1630–1634, No. 5.

## **Anexo 1**

### ***Coloração de Gram:***

1. Pode ser usado para efectuar coloração directamente em amostras clínicas ou para microrganismos em meio de cultura.
2. O primeiro passo é colocar a amostra na lamina e deixar secar.
3. Fixar com metanol.
4. Cobrir o esfregaço com Violeta de Cristal durante 10 a 30 segundos. Passar em água corrente.
5. Adicionar o Lugol durante 20 a 60 segundos. Passar em água corrente.
6. Adicionar o descorante (Alcool-Acetona) e deixar actuar durante 10 a 30 segundos. Passar em água corrente.
7. Por fim colocar Fucsina durante 30 a 60 segundos. Passar por água e deixar secar.
8. Observar ao microscópio em objectiva de imersão (100X).
9. Este procedimento está descrito no KIT Gram Stain®(Salubris, Inc)

## **Anexo 2**

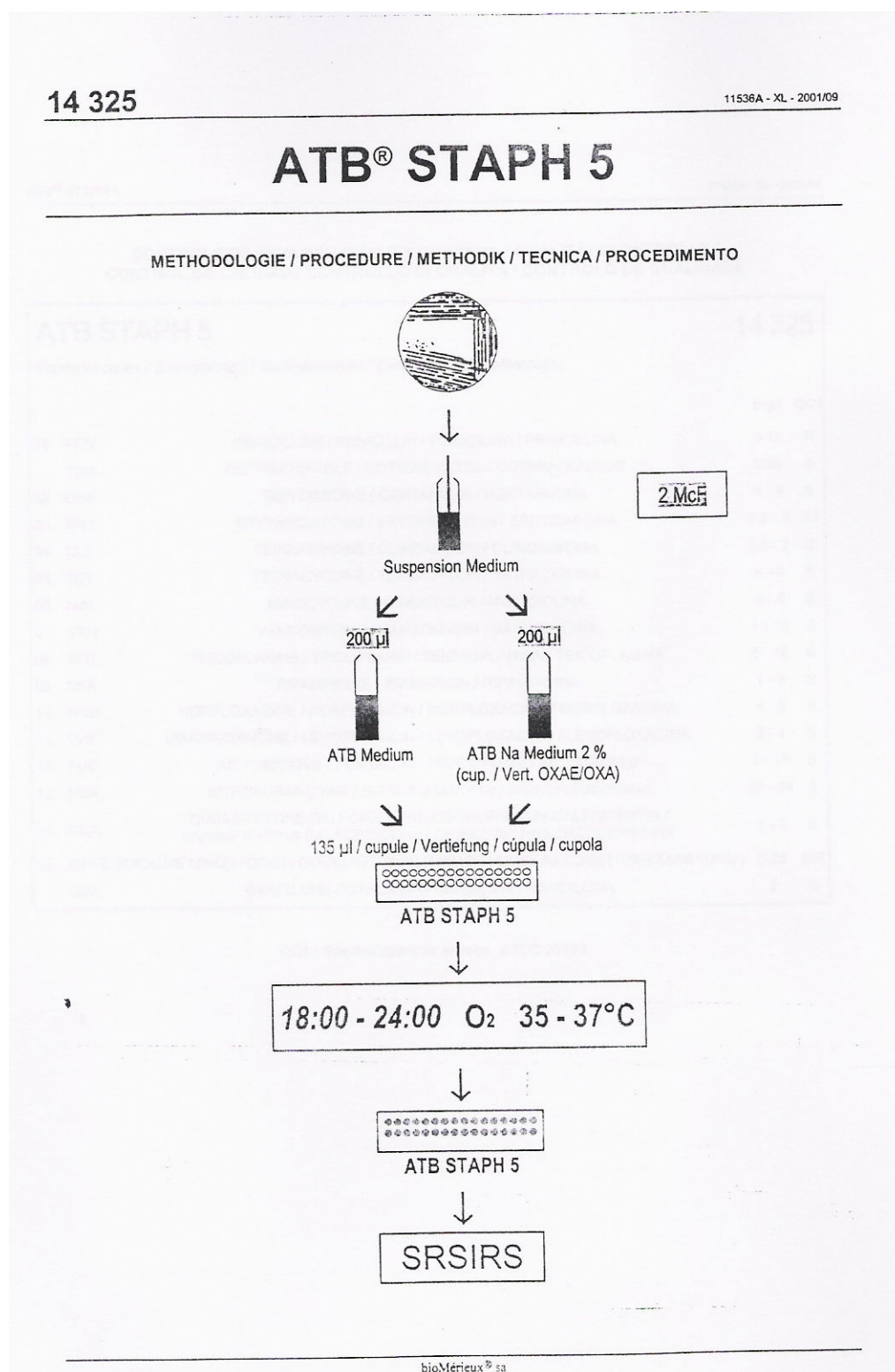
### ***Procedimento do teste da Catalase:***

É efectuada segundo procedimento operativo interno da instituição. Colocou-se uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% numa lâmina, adicionou-se uma colónia do microrganismo. Formação de bolhas corresponde a uma reacção positiva.

### ***Procedimento do teste da Coagulase:***

Para realizar este teste foi usado o Kit Pastorex™ Staph - Plus® (BioRad). Este é um teste de látex. Coloca-se uma gota de reagente látex no card de aglutinação. Com uma ansa um palito de plástico recolhe-se 1 a 3 colónias, colocando na gota de reagente. Homogeneizar durante 30 segundos. Ocorre uma reacção positiva quando existe aglutinação, ou seja, formação de agregados.

### Anexo 3.



Anexo 4.

